

**Der Einfluss von pränatalem Stress auf die  
Myelinisierung  
und  
Formierung des neuronalen Netzwerkes  
im fetalen Schafgehirn**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von  
Julia Quendt  
geboren am 05. September 1987 in Gotha

**Gutachter:**

- 1. Prof. Dr. med. Matthias Schwab / Jena**
- 2. Prof. Dr. med. Richard Berger / Neuwied**
- 3. PD Dr. med. Bernd Romeike / Jena**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.05.2014**

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2 EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Klinische Bedeutung von pränatalem Stress für den Feten</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Fetale Hirnentwicklung</b>	<b>5</b>
2.2.1 Embryonale Hirnentwicklung	5
2.2.2 Zellproliferation und Migration	5
2.2.3 Neuronale und gliale Differenzierung	6
2.2.4 Zerebrale Myelinisierung	7
2.2.4.1 Aufbau und biochemische Zusammensetzung der Myelinscheide	7
2.2.4.2 Funktion und Bedeutung der Myelinscheide	9
2.2.4.3 Herkunft und Differenzierung der Oligodendrozyten	10
2.2.4.4 Zeitlicher Verlauf der Myelinisierung	11
<b>2.3 Effekte von pränatalem Stress auf die fetale Hirnentwicklung</b>	<b>13</b>
2.3.1 Zerebrale Effekte von mütterlichem Stress	13
2.3.2 Zerebrale Effekte einer pränatalen Glukokortikoidtherapie	14
2.3.3 Regulation der Stressachse	16
2.3.4 Effekte von mütterlichem Stress und einer pränatalen Glukokortikoidtherapie auf die Entwicklung der Stressachse	18
<b>2.4 Mechanismen der Effekte von pränatalem Stress</b>	<b>19</b>
2.4.1 Übertragung von mütterlichem Stress auf den Feten	19
2.4.2 Rezeptorvermittelte Wirkung von Glukokortikoiden	20
2.4.3 Pränataler Stress und Wachstumshormone	21
<b>2.5 Zielstellung der Arbeit</b>	<b>22</b>

<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>25</b>
<b>3.1</b>	<b>Experiment</b>	<b>25</b>
3.1.1	Experimentelles Protokoll	25
3.1.2	Gewinnung der fetalen Gehirne und Herstellung der Präparate	27
<b>3.2</b>	<b>Histochemische und immunhistochemische Färbungen</b>	<b>28</b>
3.2.1	Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin	28
3.2.2	Silber-Imprägnation nach Bielschowsky	29
3.2.3	Immunhistochemischer Nachweis von MBP	31
<b>3.3</b>	<b>Lichtmikroskopische und PC-gestützte Auswertung</b>	<b>35</b>
<b>3.4</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Körpergewicht und Hirngewicht nach pränatalem Stress</b>	<b>40</b>
<b>4.2</b>	<b>Zerebrale Effekte von pränatalem Stress</b>	<b>42</b>
4.2.1	Ausbildung neuronaler Fortsätze in der weißen Substanz	42
4.2.1.1	Subkortikale weiße Substanz	42
4.2.1.2	Corpus callosum	47
4.2.1.3	Tiefe weiße Substanz – Corona radiata	49
4.2.1.4	Capsula interna	51
4.2.2	Myelinisierung neuronaler Fortsätze in der weißen Substanz	53
4.2.2.1	Subkortikale weiße Substanz	53
4.2.2.2	Corpus callosum	58
4.2.2.3	Tiefe weiße Substanz - Corona radiata	60
4.2.2.4	Capsula interna	62
4.2.3	Ausbildung neuronaler Strukturen im Hippocampus (CA3-Region)	64

<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>69</b>
<b>5.1</b>	<b>Methodendiskussion</b>	<b>69</b>
5.1.1	Tiermodell	69
5.1.2	Stressmodell	70
5.1.3	Histologie	72
5.1.4	Quantitative Bildanalyse	74
<b>5.2</b>	<b>Ergebnisdiskussion</b>	<b>75</b>
5.2.1	Pränataler Stress und fetales Wachstum	75
5.2.2	Effekte nach pränatalem Stress auf den Hippocampus	78
5.2.3	Zerebrale Effekte nach pränatalem Stress auf das neuronale Netzwerk	79
5.2.4	Zerebrale Effekte nach pränatalem Stress auf die Myelinisierung	82
<b>6</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS</b>	<b>86</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b>	<b>102</b>
<b>8.1</b>	<b>Danksagung</b>	<b>102</b>
<b>8.2</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>103</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Complex
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-/ Hyperaktivitätsstörung
AK	Antikörper
AP	Arbeitspuffer
AP+T	Arbeitspuffer+Triton-X-100
AP+T+S	Arbeitspuffer+Triton+Serum
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
AVP	Arginin-Vasopressin
BM	Betamethason
CNP	2'-3'-Cyclic nucleotid 3'-phosphohydrolase
(p)CRH	(plazentares)Corticotropin-Releasing-Hormon
GR	Glukokortikoidrezeptor
GT	Gestationstag(e)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
11 $\beta$ -HSD2	11- $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Typ-2
IGF	Insulin like growth factor
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MBP	Myelin Base Protein (basisches Myelinprotein)
MOG	Myelin/Oligodendrozyten Glykoprotein
MR	Mineralokortikoidrezeptor
MW	Mittelwert
OMgp	Oligodendrozyten-Myelin Protein
PBS	Phosphatpuffer
PLP	Proteolipid Protein
REM	Rapid-Eye-Movement
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SSW	Schwangerschaftswoche

# 1 Zusammenfassung

Es gibt Hinweise darauf, dass pränataler Stress eine wesentliche Bedeutung für die Entstehung von neuropsychiatrischen Störungen sowie Verhaltensauffälligkeiten im späteren Leben hat. Welche genauen Mechanismen und strukturellen sowie funktionellen Veränderungen im fetalen Gehirn dafür verantwortlich sind, ist bisher nur unvollständig verstanden. Einige Studien legen jedoch nahe, dass Stress während der Schwangerschaft direkte Auswirkungen auf die Reifung und Entwicklung des fetalen Gehirns hat.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob pränataler Stress einen Einfluss auf die Myelinisierung und Reifung des neuronalen Netzwerkes im zentralen Nervensystem hat. Da die mit Stress einhergehende Freisetzung von Kortisol eine Hemmung der Zellproliferation zur Folge hat, untersuchten wir überdies, ob pränataler Stress zu einer Beeinträchtigung des fetalen Wachstums führt.

Zur Prüfung der oben genannten Hypothesen diente das chronisch instrumentierte fetale Schaf, welches sich seit den 1970er Jahren als Modell für die menschliche Fetalperiode etablierte.

Insgesamt wurden die Gehirne von 45 Schaffeten im Alter von 110 und 130 Gestationstagen (GT) (natürliche Gestationsdauer 150 Tage), entsprechend 0,73 und 0,86 der Trächtigkeit analysiert. Zuvor wurden die trächtigen Tiere vom 30.-100. GT (0,20 - 0,66 der Trächtigkeit) durch eine jeweils 180-minütige Isolation an zwei Tagen der Woche chronisch gestresst. Für das Schaf, ein Herdentier, stellt die Isolation einen artgerechten Stressor dar.

Ausgewertet wurde die Entwicklung des neuronalen Netzwerkes und der Myelinisierung in der subkortikalen weißen Substanz (frontaler Kortex), dem Corpus callosum, der tiefen weißen Substanz (Corona radiata) und der Capsula interna. Die Auswahl dieser Hirnregionen erlaubt die Beurteilung der Myelinisierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten, da die Myelinisierung einem zeitlichen Gradienten folgt (zentral gelegene Nervenfortsätze myelinisieren eher als peripher gelegene). Des Weiteren wurde das neuronale Netzwerk in der CA3-Region des Hippocampus untersucht, da insbesondere Schädigungen in dieser Struktur des Gehirns für Verhaltensauffälligkeiten und Lerndefizite verantwortlich gemacht werden.

Für die Darstellung der Axone und Dendriten diente die Silberimprägnation nach Bielschowsky. Die Myelinisierung wurde durch den immunhistochemischen Nachweis des basischen Myelinproteins (MBP) bewertet.

Pränataler Stress führte im ventralen und dorsalen Abschnitt des Hippocampus zu einer verminderten strukturellen Dichte im neuronalen Netzwerk der CA3-Region am 130. GT. Am 110. GT konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass Stress im 1. und 2. Trimenon die hippocampale Reifung prolongiert beeinflusst.

In der subkortikalen weißen Substanz des frontalen Kortex, dem Corpus callosum, der tiefen weißen Substanz (Corona radiata) und der Capsula interna, konnte kein Effekt auf die Dichte des neuronalen Netzwerkes und die Myelinisierung gezeigt werden.

Des Weiteren führte chronischer Stress im 1. und 2. Trimenon zu einem verminderten fetalen Körpergewicht, wie es auch in der humanen Situation beschrieben wird. Ein möglicher Mechanismus für diese Wachstumsverzögerung ist die Verminderung der Zellproliferation zu Gunsten der Zelldifferenzierung. Im Gegensatz zu dem verminderten Körpergewicht, hatte pränataler Stress keinen Einfluss auf das Hirngewicht. Dies steht in Übereinstimmung mit dem fehlenden Effekt auf die Myelinisierung, welche im untersuchten Alter wesentlich zum Hirnwachstum und damit -gewicht beiträgt. Schließlich spricht ein vermindertes Körpergewicht bei unverändertem Hirngewicht am ehesten für eine stressbedingte asymmetrische Wachstumsretardierung.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit wird deutlich, dass pränataler Stress einen Einfluss auf die Entwicklung des fetalen Gehirns hat. In welcher Ausprägung sich die zerebralen Veränderungen im späteren Leben funktionell bemerkbar machen und inwieweit sie reversibel sind, könnte im Wesentlichen von der Intensität des Stressors und dem Gestationszeitpunkt der Stressung abhängig sein und sollte Schwerpunkt zukünftiger Untersuchungen sein.



## **2 Einleitung**

### **2.1 Klinische Bedeutung von pränatalem Stress für den Feten**

Bei dem klassischen Konzept unserer Krankheitslehre stehen vor allem genetische Dispositionen und Umwelteinflüsse im Blickpunkt der Pathogenese altersassoziierter Erkrankungen. Diesbezüglich werden meist postnatal auftretende Risikofaktoren genannt. Epigenetische Faktoren wie mütterlicher Stress oder eine erhöhte fetale Stresshormonkonzentration (in Folge einer pränatalen Glukokortikoidbehandlung, wie sie in etwa 10% aller Schwangerschaften bei drohender Frühgeburt zur Förderung der fetalen Lungenreifung eingesetzt wird) können jedoch schon vor der Geburt eine unumkehrbare Prädisposition für die Entstehung von Erkrankungen im späteren Leben darstellen. Hierfür verantwortlich sind Veränderungen der Genregulation und Genexpression, die zu einer dauerhaften Modifikation physiologischer Systeme führen. Dieser Vorgang wird auch „fetale Programmierung“ bezeichnet (Schwab 2009). In Übereinstimmung damit konnten klinische Studien nachweisen, dass pränataler Stress kognitive Defizite begünstigt und die Anfälligkeit für Verhaltensstörungen im Kindes -und Erwachsenenalter fördert (Wadhwa 2005, Weinstock 2001).

Im Jahr 1993 stellte der britische Epidemiologe Barker seine heute weit akzeptierte Hypothese auf, dass ein niedriges Geburtsgewicht in engen Zusammenhang mit der Entstehung und dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen im Erwachsenenalter steht (Barker et al. 1993). Angestoßen durch diese Studie, welche den pränatalen Ursprung einer Erkrankung in deren Pathogenese einbezog, war eine Zunahme epidemiologischer und tierexperimenteller Studien zu verzeichnen, die sich mit der Entstehung von kognitiven Störungen und Erkrankungen im späteren Leben durch den Einfluss von pränatalem Stress beschäftigten.

Mütterlicher Stress, Angst, Depressionen, externe Einflüsse wie Naturkatastrophen, Krieg oder der Verlust des Partners während der Schwangerschaft stehen in engem Zusammenhang mit der Entstehung von psychischen und physischen Erkrankungen sowie Verhaltensauffälligkeiten bei den Nachkommen (Van den Bergh 2005, Beversdorf 2005, Huizink 2004, Watson 1999, Van Os & Selten 1998). Die Intensität des Stresserlebens unterscheidet sich zwischen den Individuen und hängt von deren

individuellen Ressourcen ab. Hier spielen der sozioökonomische Status, Lebensstandard, die Persönlichkeitsstruktur und das soziale Umfeld der werdenden Mütter eine entscheidende Rolle (Hogue & Bremner 2005, Mulder 2002, Wadhwa 2001, Ruiz & Fullerton 1999, Lazarus 1984). Dies erschwert die Objektivierbarkeit von pränatalem Stress in klinischen Studien und macht standardisierte, experimentelle Untersuchungen notwendig.

Weitere spezifische Erkrankungen, die laut aktueller Studienlage mit pränatalem Stress in engem Zusammenhang stehen, kommen vor allem aus dem neuropsychiatrischen Bereich. So ist die Entstehung einer Schizophrenie, neben einer genetischen Veranlagung, mit pränatalen Stresssituationen assoziiert (Mueser & McGurk 2004, Kinney et al. 1999, Van Os & Selten 1998). Hinsichtlich der Pathogenese der Depressionen gibt es Hinweise darauf, dass bereits einzelne belastende Ereignisse während der Schwangerschaft zu einer Zunahme der Inzidenz von schweren Depressionen bei den Nachkommen führen können (Watson et al. 1999), wenngleich die Studienlage uneinheitlich ist (Schlotz & Phillips 2009). Nicht zuletzt beeinflussen mütterlicher Stress und ein niedriges Geburtsgewicht die kognitiven Fähigkeiten der Kinder und spielen eine Rolle bei der Entwicklung von Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörungen (Schlotz & Phillips 2009, Rice et al. 2007, Rodriguez & Bohlin 2005, Van den Bergh & Marcoen 2004).

Neben dem in den 1970er Jahren erstmals formulierten Konzept der fetalen Programmierung, bei dem fetal erhöhte Stresshormone unter anderem programmierende Effekte (Sollwertverstellung) auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN-Achse) haben (Kapitel 2.3.3), scheint auch die Entstehung von morphologisch-strukturellen Veränderungen im fetalen Gehirn eine wesentliche Rolle bei der Beeinflussung der Hirnfunktion im späteren Leben zu spielen. Hierbei führen Stress -und Wachstumshormone zu einer Modulation in der Entwicklung des neuronalen Netzwerkes (Schwab 2007). Dieser Vorgang ist bisher jedoch nur unzureichend verstanden.

## **2.2 Fetale Hirnentwicklung**

Die Entwicklung und Reifung des Zentralen Nervensystems ist ein hochspezialisierter, sensibler und komplexer Vorgang, der einer Vielzahl von Einflussfaktoren unterliegt. Um die Zusammenhänge besser zu verstehen, soll im Folgenden kurz auf die Entwicklung wichtiger zerebraler Strukturen eingegangen werden.

### **2.2.1 Embryonale Hirnentwicklung**

Aus dem äußeren Blatt der dreischichtigen Keimscheibe entwickelt sich etwa am 17. Embryonaltag, durch Anreiz (Induktion) des darunter liegenden Mesoderms und der Chorda dorsalis, das Neuroektoderm (Trepel 2004). Aus diesem Bereich geht später die Neuralplatte hervor, welche sich zur Neuralrinne senkt und durch morphogenetische Bewegungen zum Neuralrohr schließt (Neurulation) (Ulfig 2005). Am kranialen Ende des Neuralrohres entwickelt sich das Gehirn, am kaudalen Ende das Rückenmark. Nach dem Schluss des Neuralrohres am 25. Embryonaltag entwickeln sich die drei primären Hirnbläschen: Prosencephalon-(Vorderhirn), Mesencephalon- (Mittelhirn) und Rhombencephalonbläschen (Rautenhirn). Aus dem Prosencephalonbläschen werden das Telencephalon (Endhirn) und das Diencephalon (Zwischenhirn). Das Mesencephalonbläschen wird zum Mittelhirn, aus dem Rhombencephalon entsteht rostral das Metencephalon (Nachhirn) und caudal das Myelencephalon (Verlängertes Mark, Medulla oblongata). Aus dem Metencephalon entwickelt sich dorsal das Cerebellum (Kleinhirn) und ventral die Pons (Brücke) (Ulfig 2005, Trepel 2004).

### **2.2.2 Zellproliferation und Migration**

Das Neuralrohr besteht aus Neuroepithel, welches später die Grundlage zur Entstehung von Nerven- und Gliazellen bildet. Mikroskopisch werden in der Zellwand des Neuralrohres drei abgrenzbare Schichten sichtbar. Zwischen der inneren Auskleidung - der ventrikulären Zone (Stratum ependymale) und der äußeren Schicht - der marginalen Zone (Stratum marginale), befindet sich die intermediäre Mantelzone (Stratum palliale) (Trepel 2004).

Die Zellproliferation findet in der ventrikulären Zone statt und vollzieht sich zum größten Teil pränatal. Nicht jeder Neuronentyp entwickelt sich in derselben Region oder zur selben Zeit. Der Hauptanteil der Gliazellen proliferiert erst nach den Neuronen. Pränatal werden fast doppelt soviel Neurone gebildet wie schließlich im adulten Gehirn vorhanden sind, nicht mehr benötigte Neurone werden im Zuge der zerebralen Entwicklung durch Apoptose beseitigt (Trepel 2004).

Da der Entstehungsort eines Neurons meist in erheblicher Entfernung zu dessen endgültiger Position liegt, findet im Anschluss an die Proliferationsphase eine Migration der Neuroblasten entlang spezieller radiärer Gliafasern statt (Ulfig 2005, Wehner & Gehring 1995). Die Migration der undifferenzierten Neurone aus dem Proliferationsepithel des Neuralrohres bis zur Kortexoberfläche beginnt in der 8. SSW und endet etwa in der 30. SSW (Michaelis & Niemann 2004). Ein nächster zellulärer Navigationsprozess setzt mit dem Auswachsen der Axone ein. Dabei dienen Zelladhäsionsmoleküle und chemische Gradienten neurotropher Faktoren (zum Beispiel Nervenwachstumsfaktor) der axonalen Weg- und Zielerkennung. Haben die Wachstumskegel der Axone ihren Zielort erreicht, können diese zu Synapsen differenzieren und Zell-Zell Kontakte knüpfen (Wehner & Gehring 1995). Mit Beginn der letzten Pränatalphase, zwischen der 29. und 40. SSW, steht die Verzweigung des Dendritenbaumes im Vordergrund. Synaptische Verknüpfungen werden dichter und die Myelinisierung der Axone schreitet fort (Michaelis & Niemann 2004).

### **2.2.3 Neuronale und gliale Differenzierung**

Aus den neuroektodermalen Zellen des Neuralepithels entstehen pluripotente Stammzellen. Ein Teil dieser gemeinsamen Vorläuferzellen entwickelt sich zu Neuroblasten und Glioblasten, der andere Teil geht durch Apoptose zugrunde.

Die Differenzierung zu Neuronen und Gliazellen (Makroglia) unterliegt umgebungsspezifischen Einflüssen und zellintrinsischen Faktoren.

In der ersten Hälfte der Schwangerschaft werden bereits sämtliche kortikale Neurone unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren angelegt. Etwa zeitgleich entstehen Radialglia, welche für die Migration der Neurone zum Kortex von Bedeutung sind.

In der Folge kommt es zur Differenzierung von Astrozyten. Die Ausbildung der Oligodendrozyten erfolgt als eine der letzten Zellen im ZNS, nachdem Neurone

gebildet wurden und deren Axone Verbindungen zu ihrem Zielort geschaffen haben (Trepel 2004, Morris et al. 1996, Levison et al. 1993).

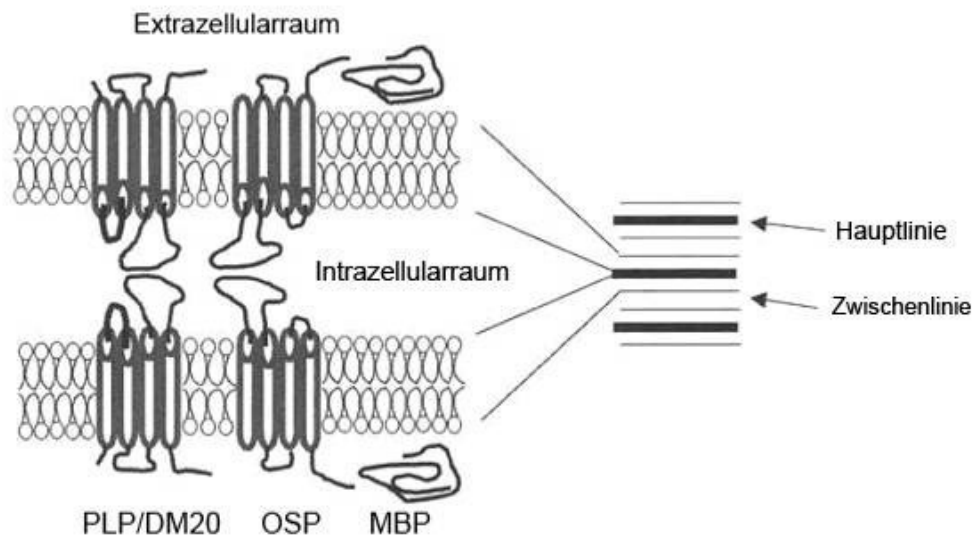
## **2.2.4 Zerebrale Myelinisierung**

### **2.2.4.1 Aufbau und biochemische Zusammensetzung der Myelinscheide**

Im ZNS werden die Myelinscheiden von den Oligodendrozyten gebildet. Diese besitzen wenige, kaum verzweigte Fortsätze welche mehrfach das Axon konzentrisch umhüllen. Ein einziger Oligodendrozyt kann mehrere Axone gleichzeitig spiralförmig umwickeln. Im Querschnitt des Axons entsteht der Eindruck einer lamellenartigen Struktur (Trepel 2004).

Elektronenmikroskopisch lässt sich der lamellenartige Aufbau wie folgt charakterisieren. Die innerhalb der Myelinscheide eng aufeinander haftenden ehemaligen Zellmembranen schließen den einstigen Intrazellularraum ein und bilden die so genannten „Major dense lines“-Hauptlinien. Die Außenseiten der ehemaligen Zellmembranen schließen den Extrazellularraum ein und bilden die so genannten „Intraperiod lines“-Zwischenlinien (Boggs 2006).

Im peripheren Nervensystem ist der Aufbau der Myelinscheide gut charakterisiert. Ein von den Fortsätzen eines Oligodendrozyten umfasster Abschnitt entlang eines Axons (Internodium) ist circa 150-200 µm lang und wird von den dazwischen liegenden nodalen Bereichen, den Ranvier'schen Schnürringen, unterschieden. In den Ranvier'schen Schnürringen befinden sich eine Vielzahl von Natrium- und Kaliumkanälen, die für die Entstehung des Aktionspotentials von Bedeutung sind. In der umliegenden paranodalen Region wird der Kontakt jeder einzelnen Lamelle mit dem Axon ermöglicht.



**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung zum Aufbau der Myelinscheide  
Modifiziert nach Jeff & Tiwari-Woodniff 2006.

Die typische Ultrastruktur der Myelinscheide mit alternierenden elektronendichten Linien entsteht nach der Kompaktierung, dem Entfernen des Zytoplasmas aus dem Myelin. Paranodien, innerste und äußerste Lamelle bleiben als nichtkompaktierte, zytoplasmatische Bereiche erhalten. Dadurch kommt es zur Kompartimentierung des Myelins in Subdomänen: kompaktes Myelin, inneres Mesaxon, äußeres Mesaxon und Paranodien (Übersicht in Raine 1984).

Biochemisch unterscheidet sich die Myelinmembran von anderen biologischen Membranen (Morell et al. 1994).

Das Myelintrockengewicht setzt sich aus 70% Lipiden und 30% Proteinen zusammen. Damit besitzt die Myelinscheide im ZNS einen weitaus höheren Lipidanteil als andere Biomembranen, die zumeist nur aus 35-40% Lipiden bestehen. Die Lipidkomponente setzt sich zusammen aus 32% Glykolipiden, 26% Cholesterin und 42% Phospholipiden (Morell et al. 1994).

Die wichtigsten Proteine im zentralen Myelin sind das Proteolipid Protein (PLP), seine Isoform DM 20 und das basische Myelinprotein (MBP).

PLP bildet mit 50% die Hauptmasse der Proteinkomponente im kompakten Myelin. Eine Mutation im PLP/DM-20 Gen resultiert in einer verminderten Myelinisierung mit Degeneration und vorzeitigem Untergang der Oligodendrozyten (Griffiths et al. 1998, Klugmann et al. 1997).

MBP ist ein zytoplasmatisches, membranassoziertes Protein. Es bildet neben PLP mit 30-40% den Hauptbestandteil des kompakten Myelins. Des Weiteren ist MBP ein Marker reifer Oligodendrozyten. Vermutlich spielt es eine regulatorische Funktion im Prozess der Myelinisierung (Pedraza et al. 1997). Nach Beginn der Myelinproduktion verbreitet sich MBP in den Zellfortsätzen auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran. Dort trägt es zur Bildung und Stabilisierung der kompakten Myelinscheiden bei (Pfeiffer 1993). Mutationen im MBP-Gen gehen mit einer schweren Dysmyelinisierung einher.

PLP und MBP machen etwa 80% der gesamten Myelinproteine aus und spielen eine wesentliche Rolle bei der Membranstabilisierung (Pfeiffer et al. 1993, Brunner et al. 1989).

Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG), Myelin/Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG), Oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) und 2'-3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase (CNP) sind weitere Bestandteile der Myelinscheide, welche hier nur erwähnt seien (Pfeiffer et al. 1993).

#### **2.2.4.2 Funktion und Bedeutung der Myelinscheide**

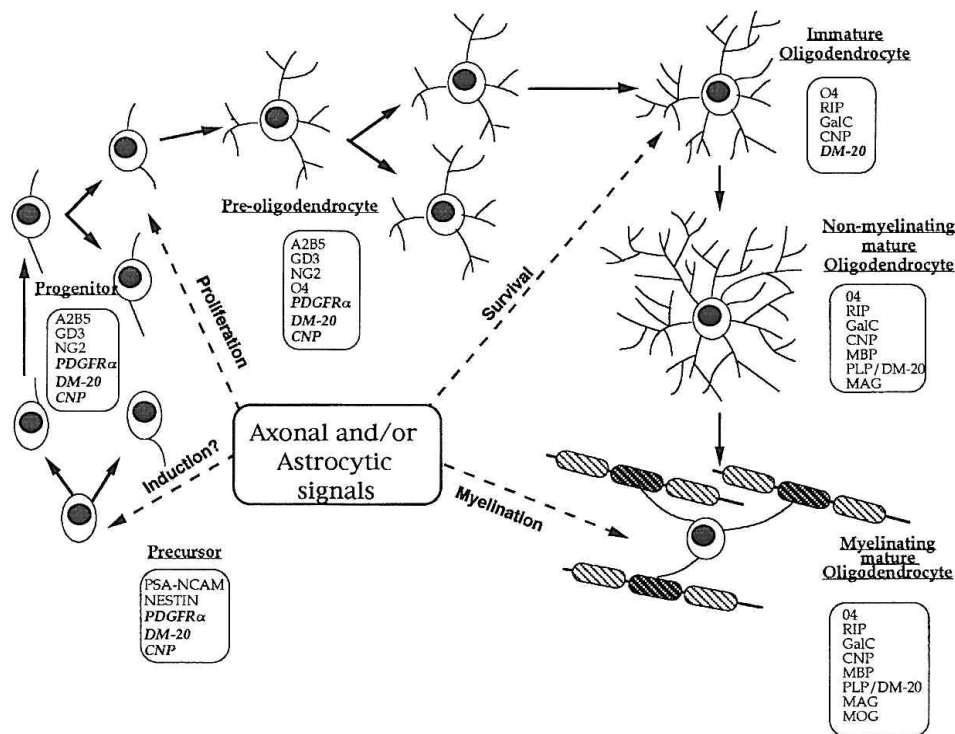
Die das Axon eines Nervs umhüllende Myelinscheide ist die häufigste Membranstruktur im ZNS der Wirbeltiere und ein essentielles Element für das Erbringen höherer kognitiver Leistungen (Baumann & Pham-Dinh 2001).

Eine wesentliche Aufgabe der Markscheide ist die elektrische Isolierung axonaler Fortsätze. Hierdurch wird es möglich, dass ein Aktionspotential schnell und effektiv über lange Distanzen weitergeleitet werden kann. In den Bereichen, in denen die Myelinscheide das Axon nicht umhüllt - den Ranvier'schen Schnürringen – liegt eine große Anzahl an spannungsgesteuerten Natrium- und Kaliumkanälen vor. Dies hat zu Folge, dass ein elektrischer Reiz nicht kontinuierlich am Axon entlang weitergeleitet wird, sondern das Aktionspotential von Schnürring zu Schnürring „springt“. Mit zunehmender Dicke der Markscheide und mit größer werdendem Abstand der Schnürringe gewinnt die saltatorische Reizweiterleitung an Effektivität.

Außerdem kommt der axonalen Ummantelung eine Bedeutung im Sinne der Ernährung und Stütze einzelner Nervenfasern zu (Trepel 2004, Peles & Salzer 2000).

### 2.2.4.3 Herkunft und Differenzierung der Oligodendrozyten

Neurone und Gliazellen, zu denen auch die Oligodendrozyten zählen, gehen aus proliferierenden, neuroepithelialen Zellen der ventrikulären und subventrikulären Zone des Telencephalon hervor. Vorläuferstadien der Oligodendrozyten, welche eine hohe Proliferationsrate besitzen, migrieren von hier in das gesamte ZNS. Entlang der Fasern der zukünftigen weißen Substanz werden aus den Progenitorzellen Prä-oligodendrozyten, welche sich nicht weiter teilen. Aus dem Präoligodendrozyten entsteht in weiteren Schritten der unreife Oligodendrozyt. Dieser ist gekennzeichnet durch die Synthese von CNP, einem frühen Marker für das Vorhandensein von myelinspezifischen Proteinen. Nach der Differenzierung zum nicht-myelinisierenden reifen Oligodendrozyt entsteht letztlich der myelinisierende reife Oligodendrozyt, für den die Proteine MBP, MAG und PLP signifikante Reifekriterien darstellen. Die Anzahl reifer Oligodendrozyten wird bestimmt durch die Proliferationsrate der Progenitorzellen und den programmierten Zelltod (Apoptose) während ihrer Entwicklungsstadien (Baumann & Pham-Dinh 2001).



**Abb.2.2:** Schematische Darstellung der Oligozytendifferenzierung.

Eingehrahmt sind zellspezifische Marker (Baumann & Pham-Dinh 2001).



#### **2.2.4.4 Zeitlicher Verlauf der Myelinisierung**

Beim Menschen beginnt die zerebrale Myelinisierung im späten fetalen Stadium und erreicht ihr Maximum in den ersten beiden Lebensjahren (Bartzokis et al. 2004, Giedd 2004, Dobbing & Sands 1979).

Dabei beginnt die Myelinisierung in der 12.-14. SSW im Rückenmark und folgt einem zeitlich-räumlichen Muster, wobei kaudale und zentrale Strukturen eher myelinisieren als rostral und peripher gelegene (Baumann & Pham-Dinh 2001). Die Myelinisierung der Axone im Zwischen- und Großhirn erfolgt erst später und setzt sich bis in das dritte oder vierte Lebensjahrzehnt hinein fort (Sampaio & Truwit 2001). Aus einer Vielzahl von MRT-Studien (Nakagawa et al. 1998, Hittmair et al. 1994, Grodd 1993, Staudt et al. 1993 & 1994, Hayakawa et al. 1990, Stricker et al. 1990, Barkovich et al. 1988) ging hervor, dass bei Kindern im Alter von einem Monat folgende Strukturen (in der T1- und T2-Wichtung) myelintypische Signale zeigten: Medulla oblongata, Tegmentum pontis, Pedunculi cerebellares, Vermis cerebelli, Tectum mesencephali, Decussatio pedunculorum cerebelli superiorum, Thalamus, Crus posterius capsulae internae, Radiatio optica und Corona radiata (Staudt et al. 2000). Kaudal gelegene ZNS Bereiche waren bereits pränatal stärker myelinisiert als rostral gelegene (Martin et al. 1991, Hayakawa et al. 1990, Stricker et al. 1990, Barkovich et al. 1988). Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, welche einen Vergleich zwischen herkömmlichen Myelinfärbungen und dem immunhistochemischen Nachweis von MBP zum Ziel hatten, fanden myelinisierte Fasern und Axone im Hirnstamm humaner Feten in der 26. SSW (Antonow-Schlorke et al., in Vorbereitung). Dies steht in Übereinstimmung mit den bisherigen Erkenntnissen, dass die Myelinisierung im 2. Trimenon beginnt (Jakovcevski & Zecevic 2005, Tanaka et al. 1995). Des Weiteren konnten einzelne MBP+ Zellen in der kortikalen Platte nachgewiesen werden, welche die axonale Myelinisierung des humanen Kortex (mit Beginn in der Hälfte der Gestation) vorbereiten (Jakovcevski & Zecevic 2005, Back et al. 2001). Ebenso wurden MBP+ Fasern in der weißen Substanz des frontalen Lobus in der 38. SSW gefunden, was mit dem frühen Nachweis von myelinisierten Fasern in der 35.-37. SSW durch Hasegawa (1992) vereinbar ist.

Die Myelinisierung und funktionelle Entwicklung des fetalen Schafgehirns entspricht weitestgehend dem des humanen Feten (McIntosh et al. 1979, Astrom 1967). Diesbezüglich zeigten Untersuchungen zur hypoxisch-ischämischen induzierten

perventrikulären Leukomalazie (Schädigung der weißen Substanz im Rahmen der Frühgeburtlichkeit) um den Zeitpunkt 0,65 der Gestation (entsprechend der 24.-28. SSW beim humanen Fetus), eine hohe Vergleichbarkeit der Hirnentwicklung zwischen fetalem Schaf und Menschen. Hierfür sprach vor allem, dass in diesem Zeitfenster die Reifung der Oligodendrozyten im fetalen Gehirn des Schafs beginnt und zugleich ein hohes Risiko für die Schädigung der noch unreifen, periventrikulären, weißen Substanz bei frühgeborenen Säuglingen beobachtet werden kann (Back et al. 2006, 2001). Zum Zeitpunkt der Geburt weist das Gehirn des Schaffeten im Gegensatz zum Menschen einen etwas höheren Reifegrad auf (McIntosh et al. 1979, Astrom 1967). Dies könnte dafür sprechen, dass das Gehirn des Schaffeten im letzten Trimenon schneller reift.

## **2.3 Effekte von pränatalem Stress auf die fetale Hirnentwicklung**

### **2.3.1 Zerebrale Effekte von mütterlichem Stress**

Im Gegensatz zu den Effekten einer pränatalen Glukokortikoidtherapie stehen die Auswirkungen von mütterlichem Stress während der Schwangerschaft erst in den letzten Jahren im Blickpunkt der Untersuchungen. Neben retrospektiven, epidemiologischen Studien wurden hierzu insbesondere experimentelle Untersuchungen an verschiedenen Spezies durchgeführt, welche unter anderem strukturelle Veränderungen im Gehirn pränatal gestresster Feten nachweisen konnten. Diesbezüglich wurden bei den Nachkommen gestresster Rhesusweibchen (täglicher Stress während der 24. SSW) zerebrale Effekte, im Sinne einer verminderten Neurogenese im Gyrus dentatus des Hippocampus, bis ins Alter von zwei bis drei Lebensjahren nachgewiesen (Coe et al. 2003). In der gleichen Spezies zeigten sich signifikante Volumenschwankungen des Corpus callosum nach pränatalem Stress (täglicher Stress zwischen dem 90. -130. GT) (Coe et al. 2002). Durch tierexperimentelle Versuche an Ratten konnte gezeigt werden, dass pränataler Stress (über die gesamte Gestationsdauer) die Zellproliferation auf bis zu 50% reduzieren kann. Gleichzeitig fiel bei den Tieren eine erhöhte Caspase-3 Aktivität im Hippocampus auf, welche in engem Zusammenhang mit apoptotischen Zellprozessen steht (Van den Hove et al. 2006). Stress in der Spätschwangerschaft führte bei Ratten bis ins frühe Erwachsenenalter zu einer Schlafstadienfragmentierung, wie sie auch im Rahmen depressiver Erkrankungen nachgewiesen ist (Dugovic 1999).

Langzeitbeobachtungen beim Menschen weisen darauf hin, dass die Effekte und Wirkmechanismen von pränatalem Stress entscheidend vom Gestationsalter abhängen. Diesbezüglich wurde gezeigt, dass Stress in der Frühschwangerschaft stärkere verhaltensbezogene und kognitive Problem hervorruft als zum Ende der Schwangerschaft und zudem häufiger mit einer Schizophrenie assoziiert ist (Mueller & Bale 2008, Khashan et al. 2008, Malaspina et al. 2008, Schneider et al. 1999). Auch bei Kindern, deren Mütter wiederholt unter Stress und Ängsten während der Schwangerschaft litten, konnten bis in ein Alter von 7 Jahren vermehrt emotionale Probleme und Verhaltensauffälligkeiten beobachtet werden (O'Conner et al. 2003).

### **2.3.2 Zerebrale Effekte einer pränatalen Glukokortikoidtherapie**

Synthetische Glukokortikoide wie Betamethason und Dexamethason werden heute routinemäßig (bei etwa 10% der Schwangeren mit einer drohenden Frühgeburt) in der Therapie zur Induktion der fetalen Lungenreife zwischen der 24.-34. SSW eingesetzt. Hierbei wird jedoch nicht nur die Lungenreife stimuliert, sondern auch Einfluss auf die Hirnentwicklung genommen. Sowohl beim Menschen als auch beim Schaf konnte nachgewiesen werden, dass die pränatale Gabe von Glukokortikoiden zu einer Reifungsbeschleunigung des fetalen Gehirns führt (Groh 2009, Amiel-Tison et al. 2004). Dies geschieht jedoch auf Kosten einer verminderten neuronalen Proliferation und steht im engen Zusammenhang mit einem verminderten Geburtsgewicht und einem geringeren Kopfumfang zum Zeitpunkt der Geburt (Aghajafari et al. 2002, Huang et al. 1999, French et al. 1999).

Auf funktioneller Ebene ergaben Untersuchungen der Schlafstadien (Marker für die funktionelle Hirnreifung) am fetalen Schaf, eine beschleunigte Reifung des REM-Schlafs nach der Gabe von synthetischen Glukokortikoiden am 105. GT (Betamethason in klinischer Dosierung, wie es zur Induktion der fetalen Lungenreife beim Menschen eingesetzt wird) (Groh 2009). Des Weiteren führte eine pränatale Betamethasonapplikation zu Effekten auf die neuronale Erregbarkeit. Mittels Magnetenzephalografie wurde nachgewiesen, dass die Latenzzeit akustisch evozierter Potenziale beim menschlichen Fetus, nach einer Glukokortikoidtherapie, verzögert war (Schleussner et al. 2004). Außerdem hemmen Glukokortikoide in klinischer Dosierung die Atmungskettenaktivität in Mitochondrien und beeinflussen so den Hirnstoffwechsel (Schwab et al. 2006).

Auf struktureller Ebene zeigte sich bereits nach einer einmaligen Gabe von Dexamethason (in klinischer Dosierung) am nicht-menschlichen Primaten eine verminderte neuronale Dichte im Hippocampus, welche auf einer Dendritendegeneration und Depletion von Pyramidenzellen beruhte (Uno et al. 1994, Uno et al. 1990, Sapolsky et al. 1990). Auch unsere Arbeitsgruppe konnte am Modell des fetalen Schafs akute Störungen der Myelinisierung (unter anderen am 95. GT im Centrum semioval, der weißen Substanz, der Capsula interna und dem Corpus callosum nach BM-Applikation am 93. GT und 94. GT in klinisch vergleichbarer Dosierung) nachweisen. Chronisch zeigte sich eine Beeinträchtigung der

Myelinisierung im Centrum semiovale (am 130. GT nach BM-Applikation am 106. und 112. GT in klinisch vergleichbarer Dosierung) (Antonow-Schlorke et al. 2009).

Langzeiteffekte einer Glukokortikoidbehandlung die bis in das spätere Leben reichen sind bisher nur in wenigen prospektiven klinischen Studien untersucht und erbrachten zudem widersprüchliche Ergebnisse. In einer Follow-up-Studie (doppel-blind, Placebo-kontrolliert) an 192 Erwachsenen, die eine einmalige Betamethasonbehandlung zur Verhinderung des Atemnotsyndroms erhalten hatten, konnten bis zum 31. Lebensjahr keine Auffälligkeiten im Wachstum, der kognitiven Leistungen oder Häufungen von psychiatrischen Erkrankungen beobachtet werden (Dalziel et al. 2005). Langzeitstudien bis zu einem Lebensalter von 20 Jahren erzielten ähnliche Ergebnisse (Dessen et al. 2000, Schmand 1990). Auch eine sehr frühe Betamethasonbehandlung während der Schwangerschaft, etwa zur Therapie der kongenitalen Nebennierenhyperplasie, bewirkte keine kognitiven oder motorischen Entwicklungsstörungen in einem Nachbeobachtungszeitraum von 12 Jahren (Meyer-Bahlburg et al. 2004). Eine Pilotstudie unserer Arbeitsgruppe konnte jedoch zeigen, dass eine einzige Betamethasonapplikation zwischen der 26. und 32. SSW bei den betroffenen Kindern im Alter von 7-8 Jahren zu neuropsychologischen Auffälligkeiten, die mit einem verminderten IQ, Konzentrationsstörungen und einem ADHS-ähnlichem Verhalten einhergingen, führte. Die neuropsychologischen Auffälligkeiten waren von einer Überaktivität der autonomen Funktion begleitet (Schwab et al. 2010). In Übereinstimmung damit wurden in einer Studie an 139 Kindern, nach einer einmaligen Glukokortikoidbehandlung, subtile kognitive Defizite im Alter von sechs Jahren festgestellt (MacArthur et al. 1982). Aktuellere Studien belegen, dass insbesondere die mehrmalige pränatale Verabreichung von Betamethason (zur Induktion der fetalen Lungenreifung) bei Kindern im Alter von drei bis sechs Jahren zu Verhaltensauffälligkeiten führte (French et al. 2004).

Ursachen für die verschiedenen Ergebnisse der hier aufgeführten Langzeitstudien sind am ehesten, die Verwendung unterschiedlich sensibler Tests und Abweichungen der Applikationshäufigkeit synthetischer Glukokortikoide (einmalig oder mehrmals). Des Weiteren unterscheiden sich die primären Endpunkte der klinischen Studien voneinander, wodurch eine Vergleichbarkeit nur eingeschränkt möglich ist.

### 2.3.3 Regulation der Stressachse

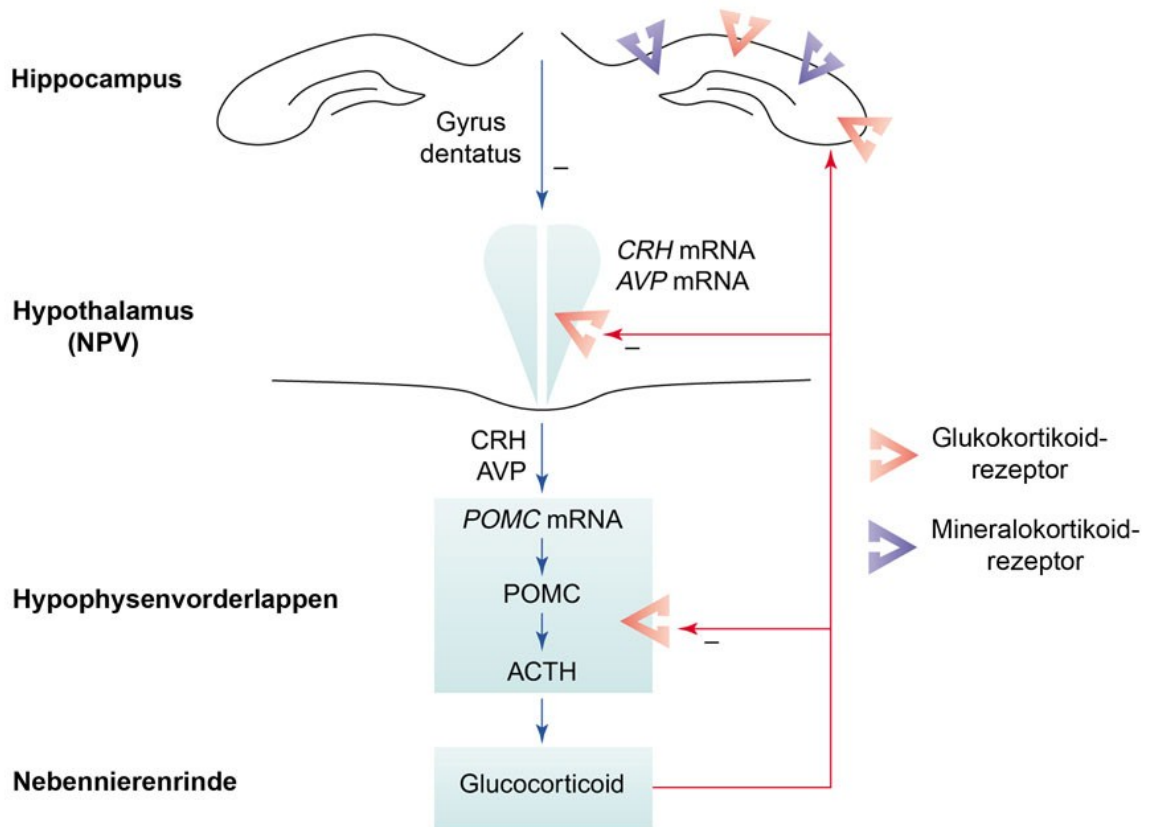
Pränataler Stress beeinflusst die Hirnfunktion im späteren Leben nicht nur durch eine gestörte Entwicklung zerebraler Strukturen, vielmehr bedingt die hohe Plastizität des fetalen Gehirns eine frühe Programmierung stressregulierender Systeme (Schwab 2007). Zu ihnen zählt neben dem sympatho-adrenergen Stresssystem die HHN-Achse (Übersichtsartikel: Miller & O'Callaghan 2002, Wurtman 2002). Da pränataler Stress zu einem Großteil durch Kortisol und die Aktivität der Stressachse vermittelt wird, konzentrieren wir uns hier insbesondere auf die Regulation der HHN-Achse (Huizink et al. 2004).

Die Konfrontation mit einem Stressor führt durch eine Stimulation spezialisierter Neurone im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus zu einer Ausschüttung von Corticotropin-freisetzendem Hormon (CRH) und Arginin-Vasopressin (AVP). Diese Hormone gelangen über die regionale Blutzirkulation zum Hypophysenvorderlappen und bewirken dort die Ausschüttung des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH). Über den Blutkreislauf erreicht ACTH die Nebennierenrinde und induziert dort die Synthese und Freisetzung von Glukokortikoiden und Mineralokortikoiden (Ulrich-Lai & Herman 2009). Die Synthese und Ausschüttung von CRH und AVP folgt einem zirkadianem Rhythmus. In den frühen Morgenstunden erreicht der Kortisolspiegel sein Maximum (Mastorakos & Ilias 2003).

Die Regulation der HHN-Achse unterliegt einer negativen Rückkopplung durch frei zirkulierendes Kortisol. Ein hoher Kortisolspiegel hemmt die Ausschüttung von ACTH im Hypophysenvorderlappen und die Freisetzung von CRH im Hypothalamus. Auf eine akute Stressreaktion folgt ein schneller negativer Feedback, welcher innerhalb von Minuten einsetzt und sensibel auf Schwankungen der Kortisolkonzentration reagiert. Eine verzögerte negative Rückkopplung, innerhalb von Stunden oder Tagen, entsteht durch dauerhaft erhöhte Kortisolspiegel und basiert auf genregulatorischen Mechanismen (Keller-Wood & Dallman 1984).

Durch dieses negative Feedback System wird die Glukokortikoid-Expositionszeit der Organe reduziert und unerwünschte Effekte minimiert (Chrousos 1998). Des Weiteren ermöglicht die unterschiedliche Verteilung von Mineralokortikoidrezeptoren (MR) und Glukokortikoidrezeptoren (GR) sowie deren spezifische Eigenschaft eine

abgestimmte physiologische Antwort auf unterschiedliche Kortisolkonzentrationen (Kapitel 2.4.2).



**Abb.2.3:** Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren Achse und Wege der negativen Rückkopplung. Corticotropin Releasinghormon (CRH), Arginin-Vasopressin (AVP), Proopiomelanocortin (POMC), Adrenocorticotropes Hormon (ACTH), Nucleus paraventricularis (NPV). Modifiziert nach Matthews 2002.

### **2.3.4 Effekte von mütterlichem Stress und einer pränatalen Glukokortikoidtherapie auf die Entwicklung der Stressachse**

Während der Schwangerschaft führen mütterlicher Stress oder eine Glukokortikoidtherapie zu einem Anstieg der Kortisolkonzentration im Blut der Mutter und des Feten. Bereits kurzfristig erhöhte Glukokortikoidspiegel (nach der zweimaligen Applikation synthetischer Glukokortikoide im Rahmen der fetalen Lungenreife) führen zu einer permanenten Desensitivierung der GR, welche in die negative Rückkopplung der HHN-Achse involviert sind. Über eine Änderung der Genexpression (DNS-Methylierung) kommt es zu einer Sollwertverstellung der HHN-Achse (Meaney et al. 2007), was im späteren Leben zu einer verminderten negativen Rückkopplung und somit zu einer dauerhaften Hyperaktivität der Stressachse führt (Weinstock 2008, McMillen & Robinson 2005, Sloboda et al. 2005, Huizink et al. 2004, Welberg & Seckl 2001). In Übereinstimmung damit zeigten Untersuchungen pränatal gestresster, juveniler und adulter Ratten eine verminderte Expression hippocampaler MR und GR, bei gleichzeitig erhöhten Kortisolwerten und einer gesteigerten Aktivität der HHN-Achse (Szuran et al. 2000, Koehl et al. 1999, Henry et al. 1994). Für das spätere Leben bedeutet dies, dass dauerhaft erhöhte Stresshormonspiegel toleriert werden und eine Stresssituation mit einer stärkeren Kortisolausschüttung beantwortet wird (Huizink 2004, Welberg & Seckl 2001).

Bemerkenswert ist, dass die Reifung der HHN-Achse und somit auch die eigene Kortisolproduktion des Feten, erst im 3. Trimenon, beim Schaf ab dem 125. GT (Challis 2001) stattfindet, mütterlicher Stress in der frühen Schwangerschaft aber bereits einen Einfluss auf die Entwicklung der Stressachse zu haben scheint (Phillips & Jones 2006, Challis et al. 2000, Dobbing & Sands 1979). Bisher sind weder die vulnerablen Phasen des Gehirns für einen erhöhten Stresshormonspiegel noch der Zeitpunkt, an dem sich negative Effekte wie eine erhöhte Stressempfindlichkeit ausprägen, genau verstanden. Eines steht jedoch fest, es wird bereits in utero festgelegt, wie der Organismus des Kindes postnatal mit Stress umgeht.



## **2.4 Mechanismen der Effekte von pränatalem Stress**

### **2.4.1 Übertragung von mütterlichem Stress auf den Feten**

Die Plazenta spielt eine entscheidende regulatorische Rolle bei dem Übertritt von Kortisol auf den Feten. Da der Fetus erst wenige Wochen vor dem Geburtstermin befähigt ist, selbst Kortisol zu produzieren, wird dieses zuvor hauptsächlich durch den plazentaren Übertritt mütterlichen Kortisols bereitgestellt. Eine angemessene Glukokortikoidkonzentration für die fetale Entwicklung liegt jedoch um ein vielfaches unter der des maternalen Blutes (Gitau et al. 2001). Um den Feten vor einem Glukokortikoidexzess zu schützen (Huizink 2004), konvertiert ein in der Plazenta befindliches Enzym, die 11- $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Typ-2 (11 $\beta$ -HSD2), 50%-90% des aktiven Kortisols in den inaktiven Metaboliten Kortison. Synthetische Glukokortikoide wie Betamethason und Dexamethason besitzen nur eine niedrige Affinität zu dem plazentaren Enzym und können somit nahezu ungehindert in die fetale Zirkulation übergehen (Sloboda 2005, Welberg & Seckl 2001).

Durch pränatalen Stress kommt es zu einer deutlichen Aktivitätsabnahme der 11 $\beta$ -HSD2. Dies fördert die Übertragung von mütterlichem Kortisol auf den Feten und führt zu einem höheren fetalen Stresshormonspiegel, wie Untersuchungen an Nagetieren zeigen konnten (Holmes et al. 2006, Welberg et al. 2005, Langley-Evans et al. 1996). Bei Frauen, die während der Schwangerschaft von einer Präeklampsie (MC Calla et al. 1998) oder Asthma (Murphy et al. 2003) betroffen waren und folglich vermehrt Stress hatten, wurde ebenfalls eine verminderte 11 $\beta$ -HSD2 Aktivität nachgewiesen.

Ein weiteres Prinzip für die Übertragung von mütterlichem Stress stellt die plazentaeigene Synthese von CRH dar (Goland et al. 1988, Robinson et al. 1988). Dieses Hormon besitzt ähnliche strukturelle und funktionelle Eigenschaften wie hypothalamisches CRH. Es ist bereits in der 7.-8. SSW nachweisbar und erreicht sein Maximum zum Geburtstermin (Frim et al. 1988). Plazentares CRH (pCRH) wird sowohl in den mütterlichen als auch in den fetalen Organismus abgegeben und unterliegt keinem negativen Feedback. Ferner stimulieren Glukokortikoide sogar die Expression des CRH-Gens in der Plazenta (Robinson et al. 1988). Dies bedeutet, dass ein hoher mütterlicher Kortisolspiegel, im Sinne eines positiven Feedbacks, die

pCRH Produktion stimuliert und über die Aktivierung des HHN-Systems die Kortisolkonzentration im fetalen Blut steigt.

Eine weitere Möglichkeit für die Übertragung von mütterlichem Stress ist die katecholaminvermittelte utero-plazentare Vasokonstriktion. Neben GR besitzt die Plazenta eine hohe Dichte an Katecholaminrezeptoren. Am Schafmodell konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg von mütterlichen Katecholaminen (Noradrenalininfusion) eine Vasokonstriktion plazentarer Gefäße zur Folge hat (Stevens & Lumbers 1995). Dies führt schließlich über eine reduzierte utero-plazentare Durchblutung zu einer verminderten fetalen Oxygenierung und bedeutet ein Weiteres mal Stress für den Feten (Challis et al. 1989).

#### **2.4.2 Rezeptorvermittelte Wirkung von Glukokortikoiden**

Die Wirkung von Kortisol wird über zwei Arten von intrazellulären Rezeptoren vermittelt. Im physiologischen Zustand bindet Kortisol mit einer hohen Affinität zu etwa 90% an Mineralokortikoidrezeptoren (MR), welche hauptsächlich hippocampal lokalisiert sind (Ahima et al. 1991). Ein Anstieg von Glukokortikoiden im Rahmen einer natürlichen Stressantwort oder einer medikamentösen Therapie führt nicht nur zur Sättigung der MR, sondern auch zu einer verstärkten Bindung an GR. Diese sind im gesamten Gehirn zu finden und werden beim Schaf im 3. Trimenon exprimiert (Brodhun et al. 2003, Reul & Kloet 1985, Rose et al. 1985). Experimenten an Ratten haben gezeigt, dass die Besetzung von GR eher für neurotoxische und Apoptose induzierende Effekte verantwortlich ist und die Bindung an MR neuroprotektive Wirkungen zu haben scheint (Hassan et al. 1996, Joels & de Kloet 1994, 1992). Dies erklärt, warum gering erhöhte Kortisolspiegel über eine Sättigung der MR zu neuroprotektiven Effekten führt. Allerdings reichen bereits die im Rahmen einer Stressreaktion physiologisch erhöhten Kortisolspiegel aus, um GR zu besetzen (Scully & Otten 1995).

### **2.4.3 Pränataler Stress und Wachstumshormone**

Mütterlicher Stress und eine pränatale Glukokortikoidtherapie führen zu einem Anstieg der fetalen Stresshormonkonzentration. Sowohl am Menschen als auch am Schaf konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter Kortisolspiegel eine beschleunigte Reifung funktioneller Systeme, welche sich in einer vulnerablen Phase befinden, zur Folge hat (Groh 2009, Amiel-Tison et al. 2004). Dies wird jedoch auf Kosten einer Wachstumshemmung (Differenzierung statt Proliferation) erreicht (Dy et al. 2008, Sloboda et al. 2005, Weinstock 2001, Welberg & Seckl 2001, White 2001). In Übereinstimmung damit zeigten sich bei pränatal mit Glukokortikoiden behandelten Feten ein vermindertes Gewicht, ein geringerer Kopfumfang (Aghajafari et al. 2002, Huang et al. 1999, French et al. 1999) und ein vermindertes Hirnwachstum zum Zeitpunkt der Geburt (Sloboda et al. 2005, Modi et al. 2001, Murphy et al. 2001).

Trotz einer eher defizitären Datenlage zu den Ursachen der Wachstumshemmung scheint insbesondere das System des Insulin like growth factor's (IGF) eine entscheidende Rolle zu spielen. Es ist unser wichtigstes Wachstumshormonsystem und wird durch epigenetische Einflüsse (z.B. DNA-Methylierung) reguliert (Chowen et al. 2002, Thissen et al. 1994). Erhöhte Stresshormonspiegel, eine pränatale Glukokortikoidtherapie oder ein mangelndes intrauterines Nahrungsangebot führen zu einer direkten Hemmung des IGF Systems (verminderte Expression von Wachstumsfaktoren durch Genrepression) und somit zu einer Hemmung der Synthese von Wachstumsfaktoren (Gicquel et al. 2008, McMillen & Robinson 2005, Meaney & Szyf 2005).

Eine abnorme Sekretion von Wachstums- und Stresshormonen konnte auch noch im späteren Leben bei schizophrenen und depressiven Patienten gezeigt werden (eine der häufigsten neuropsychiatrischen Auffälligkeiten im Alter). Vermutlich spielte auch hier die frühe Programmierung der Stressachse durch pränatalen Stress eine entscheidende Rolle. (Swaab et al. 2005, Claes 2004, Corcoran et al. 2003, Deuschle et al. 1997).

## **2.5 Zielstellung der Arbeit**

Nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft trägt mütterlicher Stress während der Schwangerschaft zu der Entstehung von neuropsychiatrischen Erkrankungen (erhöhte Inzidenz von Depressionen und Schizophrenie) und motorischen Entwicklungsstörungen bei (Kapitel 2.1). Prinzipiell können zwei wesentliche Mechanismen für die Beeinflussung der Hirnfunktion nach pränatalem Stress angenommen werden. Zum einen führen Stress- und Wachstumshormone (die Expression von Wachstumshormonen wird durch erhöhte Kortisolspiegel gehemmt) zu strukturellen Veränderungen der Hirnentwicklung und zum anderen haben Stresshormone programmierende Effekte auf die Hirnfunktion im späteren Leben (Programmierung der Stressachse), ohne dass strukturelle und funktionelle Störungen in der Entwicklung der Hirnfunktion auftreten (Kapitel 2.3). Aktuelle Studien legen nahe, dass insbesondere Stress während früher Phasen der Schwangerschaft zu wesentlichen zerebralen Veränderungen führt und verhaltensbezogene sowie kognitive Probleme im späteren Leben zur Folge hat (Kapitel 2.1). Da die Stressachse erst am Ende der Schwangerschaft reift, sind durch Stress im 1. und 2. Trimenon, bei unreifer und somit funktionell inaktiver Stressachse, insbesondere Effekte auf die strukturelle und funktionelle Hirnentwicklung zu erwarten. In Übereinstimmung hiermit konnte unsere Arbeitsgruppe bezüglich der funktionellen Hirnentwicklung am fetalen Schaf, dem wichtigsten Tiermodell für die menschliche Fetalperiode, zeigen, dass Stress im 1. und 2. Trimenon eine Fragmentierung der fetalen Schlafstadien, welche sich im 3. Trimenon entwickeln, auslöst. Eine Fragmentierung von Schlafstadien ist im späteren Leben ein typisches Zeichen von Depressionen (Kapitel 2.3.1). Ob dem eine strukturell nachweisbare Veränderung der Hirnentwicklung zugrunde liegt, ist unklar. Die modellhafte Gabe von Glukokortikoiden zeigte neurotoxische Effekte im zerebralen Kortex und Hippocampus und führte zu einer Störung der Myelinisierung (Kapitel 2.3.2). Generell ist jedoch nur unzureichend verstanden, zu welchen strukturellen Hirnentwicklungsveränderungen pränataler Stress führt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, folgende Hypothesen zu überprüfen:

1. Mütterlicher Stress während des 1. und 2. Trimenons führt zu einer Störung der Ausbildung des neuronalen Netzwerkes.
2. Mütterlicher Stress während des 1. und 2. Trimenons führt zu einer Störung der Myelinisierung neuronaler Fortsätze.

Wir untersuchten die Entwicklung und Myelinisierung der neuronalen Fortsätze in der subkortikalen weißen Substanz des frontalen Kortex, im Corpus callosum, in der tiefen weißen Substanz (Corona radiata) und in der Capsula interna.

Diese Hirnregionen wurden gewählt, da ihnen wesentliche zerebrale Funktionen zu Grunde liegen und die Myelinisierung der Nervenfortsätze in diesen Regionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfindet (zentral gelegene Nervenfortsätze myelinisieren eher als peripher gelegene).

Weiterhin wurde das neuronale Netzwerk in der CA3-Region des Hippocampus untersucht, da insbesondere Schädigungen in dieser Struktur des Gehirns für Verhaltensauffälligkeiten und Lerndefizite verantwortlich gemacht werden. Der Hippocampus hat eine wesentliche Bedeutung für das Verhalten, unser Gedächtnis und die Entwicklung von Emotionen. Er ist eine wichtige neuronale Struktur für die Regulation der Stressantwort und Ausbildung kognitiver Fähigkeiten. Zudem werden im Hippocampus neben den ubiquitär vorkommenden GR auch MR exprimiert. Experimentell konnte nachgewiesen werden, dass die Besetzung von GR eher neurotoxische Effekte induziert, während die Bindung an MR neuroprotektive Wirkungen zu haben scheint.

Des Weiteren untersuchten wir den Zusammenhang von pränatalem Stress und dem fetalen Wachstum als grobes Maß für eine Störung der Hirnentwicklung. Hierbei trägt vor allem die Myelinisierung zur normalen Entwicklung des Hirngewichtes bei. Zusätzlich zum Hirngewicht betrachteten wir das Körpergewicht der Feten, da ein erhöhter Kortisolspiegel, wie er durch Stress zustande kommt, die Zellproliferation zu Gunsten der Differenzierung hemmt.

Zur Überprüfung unserer Hypothesen wählten wir das fetale Schaf als etabliertes tierexperimentelles Modell für die menschliche Fetalperiode. Im Gegensatz zu Nagetieren, deren Gehirne sich vorrangig postnatal entwickeln, weist das Schaf

einen dem Menschen ähnlichen zeitlichen Verlauf der Hirnentwicklung auf, wenn es auch etwas schneller reift.

Insgesamt wurden die Gehirne von 45 Schaffeten ausgewertet, die zwischen 0,20-0,66 der Gestation (30.-100. GT) durch eine jeweils 180-minütige Isolation an zwei Tagen der Woche chronisch gestresst wurden. Da Schafe Herdentiere sind ist die Isolation ein ausgeprägter Stressor für diese Spezies.

Um mögliche andauernde Effekte darzustellen, wurden die Gehirne zum Zeitpunkt 0,73 (110. GT, Gestationsdauer 150 Tage) und 0,86 der Gestation (130. GT) ausgewertet.

Die Ergebnisse sollen helfen, einen weiteren Baustein zur Klärung der Effekte von pränatalem Stress auf die Hirnfunktion im späteren Leben beizutragen.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Experiment**

#### **3.1.1 Experimentelles Protokoll**

Vor Beginn der Experimente wurden alle Untersuchungen durch die Tierschutzkommission des Landes Thüringen und das Cornell University Animal Use and Care Committee genehmigt.

Die terminierte Verpaarung und chronische Stressung der Schafe erfolgte am Institut für Versuchstierkunde der Friedrich-Schiller Universität und am Friedrich-Löffler-Institut in Jena.

Insgesamt wurden für diese Arbeit 45 Schaffeten (davon 21 Stresstiere und 24 Kontrolltiere) von Merino-Schwarzkopf Schafen immunhistochemisch und histochemisch untersucht.

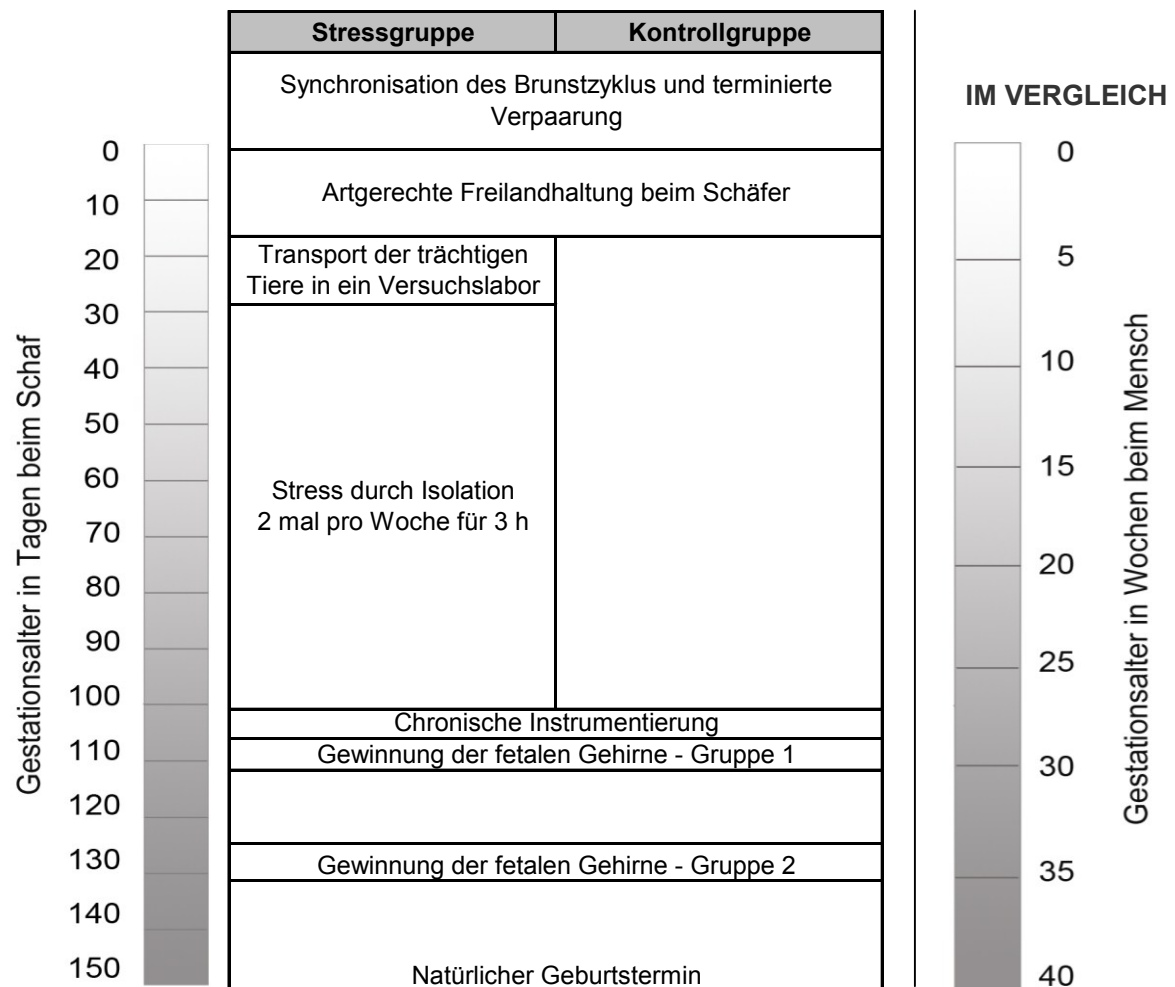
Der Versuchsablauf bis zur operativen Entwicklung der Feten oblag nicht meinem Aufgabenbereich, soll aber im Folgenden kurz erläutert werden.

Eine wichtige Voraussetzung für die vorliegenden Experimente war die exakte Kenntnis über das Gestationsalter der Versuchstiere. Dafür wurde der Brunstzyklus eines jeden weiblichen Schafes durch eine hormonelle Behandlung synchronisiert, um diese anschließend terminiert zu verpaaren. Das hierfür verwendete Verfahren ermöglicht eine Follikelreifung und Ovulationsauslösung unabhängig von der Paarungs- und Jahreszeit (Müller et al. 2003). Durch Überprüfung der Progesteronwerte am 19. GT wurde die Trächtigkeit der Tiere gesichert festgestellt.

Bei Schafen beträgt die mittlere Gestationsdauer 150 Tage. Bereits am 25. GT, 5 Tage vor Beginn der chronischen Stressung, wurden die trächtigen Schafe vom Freiland in das Versuchslabor überführt um eine Akklimatisierung der Tiere an die neue Umgebung zu gewährleisten. Die Haltung der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen mit festem zirkadianem Rhythmus von 12 h Licht und 12 h Dunkelheit, bei 20 °C Raumtemperatur und freiem Zugang zu Futter und Wasser.

Zwischen dem 30. und 100. GT wurden die trächtigen Tiere zweimal pro Woche für je 3 h in einem hellen und temperaturstabilem Raum (18 °C), außer Sicht und

Hörweite anderer Tiere isoliert, sodass am Ende des Protokolls jedes Tier 20mal der Einzelisolation ausgesetzt war. Da Schafe Herdentiere sind, reagieren sie besonders empfindlich auf diesen Stressor. Messungen des Kortisolspiegels vor und während der Isolation konnten diesen Effekt bestätigen (Rakers et al. 2012).



**Abb.3.1:** Experimentelles Protokoll

Zwischen dem 100. und 110. GT erfolgte die Instrumentierung der Feten mittels Katheter, welche der Überprüfung intrauteriner Stressantworten (ACTH und Kortisolfreisetzung) diente. Deren Auswertung ist nicht Thema der vorliegenden Arbeit (siehe Rakers 2012).

Nach Abschluss der Experimente sowie der operativen Entwicklung der Feten wurden deren Körper- und Hirngewichte bestimmt. Diese Messungen erfolgten an



Tieren der Stress- und Kontrollgruppe im Alter von 110( $\pm$ 4) und 130( $\pm$ 5) GT (Gestationsdauer: 150 Tage). Im Anschluss wurden die fetalen Gehirne für die histologische Auswertung aufgearbeitet.

### **3.1.2 Gewinnung der fetalen Gehirne und Herstellung der Präparate**

Unter tiefer Isoflurannarkose wurde das Abdomen des trächtigen Schafes mittels Medianschnitt eröffnet, ein Uterusschnitt gesetzt und der Fetus entwickelt.

Im Anschluss wurde das Muttertier durch eine i.v. Magnesiumchloridgabe getötet.

Über die Punktion der rechten Arteria carotis communis wurde mit einem nach kranial gerichteten Katheter das fetale Gehirn mit einer heparinisierten, isotonischen Kochsalzlösung blutleer gespült. Die Perfusionsfixierung des Gehirns erfolgte mit neutral gepufferter 4%iger Paraformaldehydlösung.

Nach Präparation des Gehirns aus der Kalotte wurde dieses eine Woche bei 4 °C im Fixativ belassen. Jeweils eine Hemisphäre des Feten wurde anschließend in 7 mm dicke, koronar geschnittene Gewebsblöcke geteilt. Die Gewebstücke wurden routinemäßig in einer Histokinette (Leica TP 1020, Nussloch, Deutschland) in Paraffin überführt und an einer Ausgießstation in Kassetten gegossen und gehärtet.

Am Rotationsmikrotom (Microm HM 335E, Walldorf, Deutschland) wurden 6  $\mu$ m dicke Gewebsschnitte angefertigt und auf mit Vectabond (TM) Reagent (Vector Labs, Burlingame, CA, USA) vorbehandelten Objektträgern (Super Frost, Braunschweig, Deutschland) bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Zur Vergleichbarkeit und Orientierung im Präparat wurden von jeder Hirnregion aufeinanderfolgende Schnitte angefertigt und anschließend gefärbt.

## **3.2 Histochemische und immunhistochemische Färbungen**

### **3.2.1 Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin**

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung diente der morphologisch strukturellen und orientierenden Übersicht im fetalen Schafgehirn.

Zuerst wurden die Paraffinschnitte routinemäßig mit einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert. Dieser Vorgang soll im Folgenden stellvertretend für alle weiteren Färbungen ausführlich beschrieben werden.

Für die Entfernung des Paraffins wurden die Präparate zweimalig für je 10 min in Xylolersatz Neoclear (MERCK GmbH, Darmstadt, Deutschland) gebadet. Zum Rehydrieren wurden die Schnitte anschließend zweimal je 5 min in 100%igen Alkohol belassen, ein weiteres mal für 5 min in 80%igen Alkohol überführt und abschließend für 5 min in 50%igem Alkohol 2-Propano (Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, Deutschland) eingestellt. Um die Zellkerne anzufärben, wurden die Präparate für 9 min mit Hämatoxylin nach Mayer (Fluka Chemie, Buchs, Deutschland) behandelt und unter fließendem Leitungswasser (6-8 min) differenziert. Danach wurden die Präparate in Eosinlösung (Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, Deutschland) eingebracht und so das Zytoplasma angefärbt.

Für die Entwässerung der Schnitte überführten wir diese in eine aufsteigende Alkoholreihe.

Das Ergebnis der Färbung stellt die Zellkerne blau-violett und das Zytoplasma rot-rosa dar. Das detaillierte Protokoll der Färbung ist Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Medium	Zeit [min]
Entparaffinieren:	
2x Neoclear	10
2x Isopropanol 100%	5
1x Isopropanol 80%	5
1x Isopropanol 50%	5
Aqua dest.	5
Kernfärbung: Hämatoxylin nach Mayer	9
Bläuen: Fließendes Leitungswasser	6-8
Aqua dest.	5
Zytoplasmafärbung: Eosin (vor Gebrauch einen Tropfen Essigsäure in die Küvette) Aqua dest.	1
Entwässern:	5
Isopropanol 50%	
Isopropanol 80%	5
2x Isopropanol 100%	5
2x Neoclear	5
Balsameinschluss mit Entellan	10

**Tab.3.1:** Protokoll zur Hämatoxylin-Eosin Färbung.

### 3.2.2 Silber-Imprägnation nach Bielschowsky

Die Silber-Imprägnation des Gehirngewebes diente der Darstellung von neuronalen Fortsätzen.

Zu Beginn wurden alle Schnitte mit einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Anschließend wurden die Präparate in 20%iger Silbernitratlösung für 1,5 h bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Nach zweimaligem Spülen in Aqua dest. badeten die Schnitte für 30 min bei 45 °C in ammoniakalischer Silbernitratlösung. Im Anschluss an mehrere Spülvorgänge wurden die Präparate für etwa 2 min in die vorab frisch hergestellte Entwicklerlösung gestellt und leicht geschüttelt. Hierbei sollte sich ein deutlicher Niederschlag in der Küvette zeigen. Nach dem Entwickeln wurden die Schnitte wiederholt gespült und für 3 min in 5%iger Natriumthiosulfatlösung (Fluka Chemie, Buchs, Deutschland) belassen. Abschließend wurden die Präparate in

einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit einem Eindeckmedium Neo-Mount (MERCK GmbH, Darmstadt, Deutschland) eingeschlossen.

Das detaillierte Protokoll der Färbung ist Tabelle 3.2 zu entnehmen.

Medium	Zeit [min] / Temp. [°C]
Entparaffinieren:	
2x Neoclear	10 / RT
2x Isopropanol 100%	5 / RT
1x Isopropanol 80%	5 / RT
1x Isopropanol 50%	5 / RT
Aqua dest.	3 / RT
Silberimprägnation:	
AgNO <sub>3</sub> 20%	90 / 37
2x Aqua dest.	
Ammoniakalische Silbernitratlösung	30 / 45
Aqua dest.+NH <sub>3</sub> (4:1)	
Na-Thiosulfat 5%	1-3 / RT
Leitungswasser	5 / RT
Aqua dest.	5 / RT
Entwässern:	
Isopropanol 50%	5 / RT
Isopropanol 80%	5 / RT
2x Isopropanol 100%	5 / RT
2x Neoclear	10 / RT
Balsameinschluss mit Entellan	

**Tab.3.2:** Protokoll zur Silberimprägnation nach Bielschowsky.

RT-Raumtemperatur.

Die Lösungen werden wie folgt hergestellt:

20%ige Silbernitratlösung (AgNO<sub>3</sub>): 100 ml Aqua dest. + 20 g Silbernitrat

5%iges Natriumthiosulfat (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>): 100 ml Aqua dest. + 5 g Natriumthiosulfat

Ansatz für die Entwicklerlösung: 25 ml Aqua dest. + 125 mg Zitronensäure (Fluka Chemie, Buchs, Deutschland) + 5 ml 36%iges Formalin (Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, Deutschland) + 8 µl konzentrierte Salpetersäure- HNO<sub>3</sub> (Fluka Chemie, Buchs, Deutschland).

Ammoniakalische Silbernitratlösung: Zu der 20%igen  $\text{AgNO}_3$  tropfenweise 25%ige Ammoniaklösung (Carl ROTH GmbH, Karlsruhe, Deutschland) geben bis ein Niederschlag entsteht, weiter Ammoniak zugeben bis sich der Niederschlag auflöst. Erneut 20%ige  $\text{AgNO}_3$  zugeben bis ein Niederschlag entsteht. Abschließend Ammoniak tropfenweise zugeben bis die Lösung klar ist.

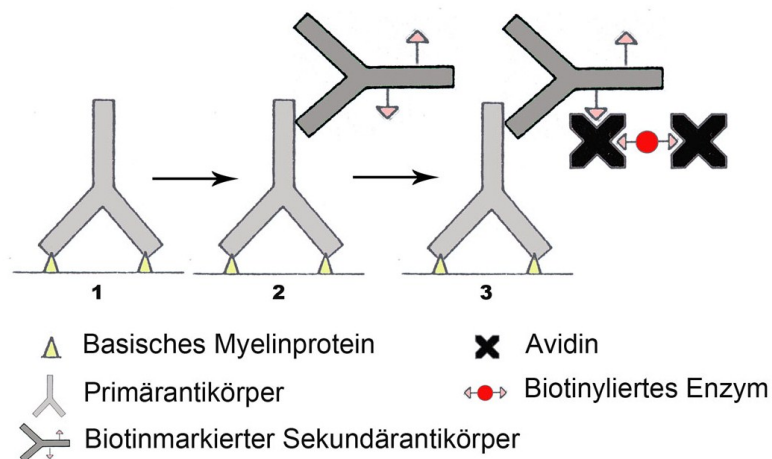
Entwicklerlösung: 50 ml Ammoniakalische Silbernitratlösung + 2 Tropfen des Ansatzes für die Entwicklerlösung.

### **3.2.3 Immunhistochemischer Nachweis von MBP**

Für die vorliegende Arbeit wählten wir den immunhistochemischen Nachweis von MBP, einem wichtigen Bestandteil der Myelinscheide im Zentralen Nervensystem und einem immunhistochemischen Marker im Fortgang der Myelinisierung.

In vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe erwies sich der Nachweis von MBP als geeigneter Marker für die Myelinisierung während der Ontogenese des fetalen Schafgehirns (Helgert 2008).

Zum Nachweis von MBP wurde die immunhistochemische Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) für Paraffinschnitte angewendet, welche im Folgenden kurz erläutert wird. Die Bildung enzymmarkierter Antikörperkomplexe beruht auf der hohen Affinität von Streptavidin oder Avidin für Biotin. Im ersten Schritt wurde ein primärer Antikörper aufgetragen, der eines oder mehrere Epitope des nachzuweisenden MBP erkennt und spezifisch bindet. Nach Ablauf einer Inkubationszeit wurde ein sekundärer biotinmarkierter Antikörper hinzugegeben, welcher an den primären Antikörper bindet. In weiteren Schritten erfolgte die Herstellung und Beigabe einer Lösung aus Avidin und biotinyliertem Enzym. Durch Bindung des Avidins an den biotinylierten sekundären Antikörper, entstand der Avidin-Biotin-Enzymkomplex (Vgl. Ambrosius & Lippa 1987). Durch die hohe Sensitivität der ABC-Methode gegenüber anderen Nachweisverfahren wird eine zuverlässige Aussage zur MBP-Immunreaktivität möglich (Hsu et al. 1981).

**Abb.3.2:** ABC-Methode

Zur Vorbereitung für die immunhistochemische Färbung wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert.

Anschließend wurden die Schnitte in Phosphatpuffer (PBS) 5 min gewaschen und in 0,01M Citratpuffer 10 min bei 750 Watt in der Mikrowelle behandelt. Dieser Vorgang soll jene Antigenorte demaskieren welche zuvor, möglicherweise durch die Präparatfixierung, maskiert wurden (Antonow-Schlorke et al. 2009). Nach zweimaligen Spülen in PBS wurden die Präparate zur Inhibition endogener Peroxidasereaktionen für 20 min in eine Lösung aus Wasserstoffperoxid und 50%igen Isopropanol im Volumenverhältnis 1:80 inkubiert und anschließend in Aqua dest. 10 min gespült. Des Weiteren wurden, durch Inkubation der Schnitte in 0,5%igem Natriumborhydrid, reaktive Aldehydgruppen blockiert.

Nach dem Spülen in Aqua dest., PBS und Arbeitspuffer mit Triton (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) erfolgte die Besetzung unspezifischer Bindungsplätze mittels Inkubation in Normalserum, Donkeyserum (Chemicon International, Temecola, CA, USA) für 30 min, bei 37 °C im Brutschrank.

Nach Auftragen des unkonjugierten Primärantikörpers (Rat Anti-Myelin Basic Protein 82-87 Region) (Chemicon International, Temecola, CA, USA) in der Verdünnung 1:500 wurden die Schnitte für 12 h bei 4 °C belassen. Es folgte ein zweimaliges Spülen für je 5 min mit Arbeitspuffer und Triton. Anschließend wurde der sekundäre biotinmarkierte Antikörper (Biotin-SP-conjugated Pure Donkey Anti-Rat IgG (H+L), Jackson immuno Research Laboratories, Hamburg, Deutschland) in Verdünnung 1:200 zugegeben und für 2 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Schnitte im ABC-Komplex - ABC KIT (Vector Labortories,

Burlingame, Kanada), einer Lösung aus Avidin (Reagenz A) und biotinyliertem Enzym (Reagenz B). Zur Beseitigung überschüssiger Komplexe erfolgte letztlich das wiederholte Spülen der Präparate in Arbeitspuffer mit Triton sowie Arbeitspuffer und PBS.

Die Visualisierung der immunhistochemischen Reaktion gelang nach Inkubation mit der chromogenen Substratlösung DAB - Sigma Fast 3,3-Diaminobenzidine Tablet Sets (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Sternheim, Deutschland).

Das Ergebnis der Reaktion ist ein dunkelbraunes, amorphes in Wasser und Ethanol unlösliches Präzipitat.

Nach mehrmaligem Spülen in Aqua dest. wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend mit einem Eindeckmedium (MERCK GmbH, Darmstadt, Deutschland) unter einem Deckglas konserviert.

Das detaillierte Protokoll zur Färbung ist Tabelle 3.3 zu entnehmen.

Medium	Zeit [min] / Temp. [°C]	Bemerkung
Entparaffinieren:		
2x Neoclear 100%	10 / RT	
2x Isopropanol 100%	5 / RT	
Isopropanol 80%	5 / RT	
Isopropanol 50%	5 / RT	
PBS	5 / RT	
Antigendemaskierung: 0,01M Citratpuffer	10 / RT	Mikrowelle 750 Watt
2x PBS	8 / RT	
Block endogener Peroxidasen: Isopropanol 50% + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20 / RT	80ml 50%Isopropanol+ 1ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%)
Aqua dest.	10 / RT	
Block reaktiver Aldehydgruppen:NaBH <sub>4</sub>	20 / RT	50mg NaBH <sub>4</sub> auf 100ml Aqua dest.
Aqua dest.	10 / RT	
PBS	5 / RT	
AP+T	5 / RT	10ml AP+ 5µl Triton-X-100
Normalserum: AP+T+Serum	30 / 37	150µl Serum auf 10ml AP+T
Primärer AK+AP/T/S	720 / 4	Verdünnung 1:500
2xAP+T	5 / RT	
Sekundärer AK+AP/T/S		5µl Sekundärer AK in 1ml AP+T+S

2xAP+T	5 / RT	
ABC-Komplex: AP+T+LösungA+LösungB	60 / 37	Je 20µl der Lösung A und B in 1ml AP+T
AP+T	5 / RT	
2x PBS	5 / RT	
Aqua dest.	5 / RT	
3'3-Diaminobenzidin (DAB)	5 / RT	1Set (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +DAB) für 5ml Aqua dest., mit Millipore-filter filtrieren
2xAqua dest.	5 / RT	
Entwässern:		
Isopropanol 50%	5 / RT	
Isopropanol 80%	5 / RT	
2x Isopropanol 100%	5 / RT	
2x Neoclear 100%	10 / RT	
Balsameinschluss mit Entellan		

**Tab.3.3** : Protokoll zum Immunhistochemischen Nachweis von MBP.

Die Lösungen werden wie folgt hergestellt:

Citratpuffer: 1 Liter Aqua dest. + 2,94 g Sodium Citrat (Fluka Chemie, Buchs, Deutschland), pH 6,0.

PBS: 1 Liter Aqua dest. + 1 g D-PBS

Arbeitspuffer: 500 ml PBS + 2,5 g Rindserumalbumin – (Albumin from bovine Serum, minimum 98%) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Sternheim, Deutschland) + 250 µl TWEEN 20 (Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Sternheim, Deutschland) pH 7,5.

DAB-Lösung (Sigma Fast DAB Substrat): 2 Tabletten (Urea Hydrogen Peroxide und 3,3-Diaminobenzidine) in 5 ml Aqua dest. schwenken, bis die Fertigtabletten vollständig gelöst sind.



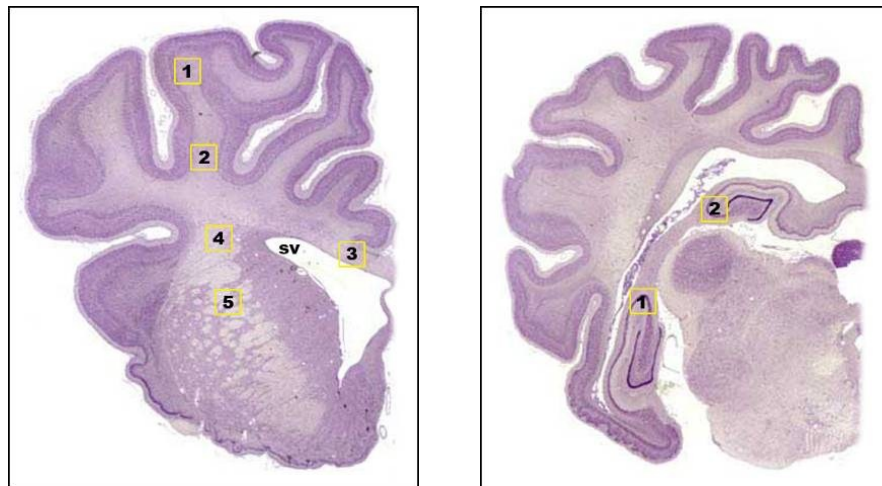
### 3.3 Lichtmikroskopische und PC-gestützte Auswertung

Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgte am Lichtmikroskop (Axioplan 2 imaging, Zeiss, Deutschland). Mit Hilfe einer Farbvideokamera (AxioCam HR, Zeiss, Deutschland) und der PC-Software Axio Vision 4.6 wurden Aufnahmen der histologischen Ausschnitte angefertigt.

Im Vorfeld jeder Aufnahme wurden standardisierte Einstellungen am Mikroskop (Helligkeit –Kunstlicht 3200 K, Graufilter, Zwischenlinse, Vergrößerung), an der Kamera (Belichtungszeit, Auflösung) und im PC-Programm (Weißabgleich, Schattenkorrektur, Autofokuseinstellung) vorgenommen, um für jede Aufnahme vergleichbare Bedingungen zu gewährleisten. Über eine Echtzeit-Bilderwiedergabe konnte das aufzunehmende Bild im Voraus begutachtet werden.

In der subkortikalen weißen Substanz des frontalen Kortex kamen zwei verschiedene Bildausschnitte zur Auswertung. Der erste Ausschnitt bildet die oberflächennahe/periphere subkortikale weiße Substanz ab. Sie befindet sich unterhalb der kortikalen Schicht VI (kortexnah) und ist die Eintrittszone der kortikalen Axone. Der zweite Ausschnitt befindet sich tiefer, auf Höhe der Sulci cerebri und bildet zentral gelegene Strukturen der weißen Substanz ab (kortexfern). Diese beiden subkortikalen Hirnregionen wurden gewählt um neben dem neuronalen Netzwerk insbesondere den Einfluss von Stress auf die Myelinisierung zu untersuchen. Hintergrund ist, dass die Myelinisierung einem zeitlichen Gradienten folgt, sodass zentral gelegene Nervenfortsätze früher myelinisieren als peripher gelegene. Somit sind der Grad der Myelinisierung und die Effekte durch Stress von der Lokalisation (peripher oder zentral/ kortexnah oder kortexfern) der untersuchten Hirnregion abhängig. Zur Untersuchung tiefer gelegener Hirnstrukturen wurden, in Höhe des Chiasma opticum, definierte Regionen aus dem Corpus callosum, der Corona radiata (tiefe weiße Substanz) und der Capsula interna ausgewählt (siehe Abb.3.3 links).

Um die Effekte von mütterlichem Stress (vom 30.-100. GT) im Hippocampus zu untersuchen, wählten wir die Darstellung der CA3-Region in einer Schnittebene, die den Hippocampus in voller Größe abbildete (siehe Abb.3 rechts). Die CA3-Region wurde bereits in einer Vielzahl von Studien beschrieben (Kapitel 5.2.2).



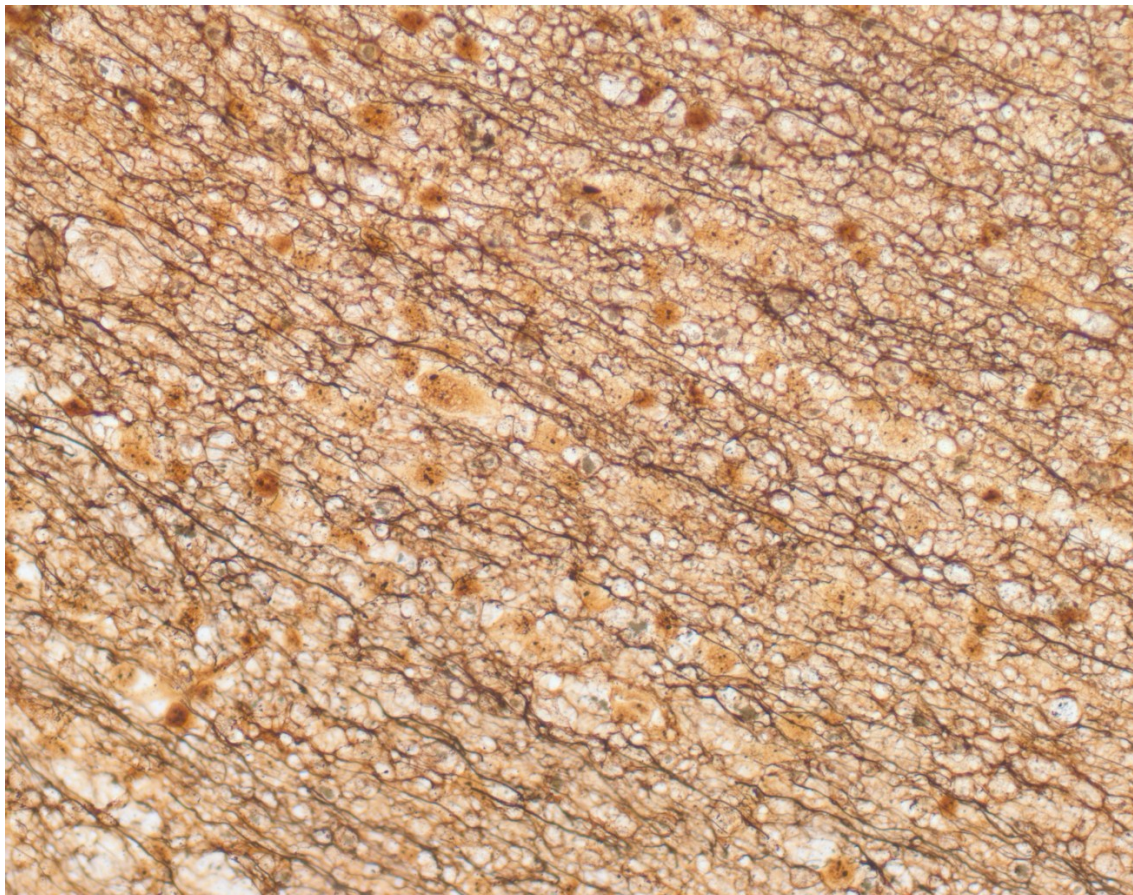
**Abb.3.3:** HE-Übersichtsfärbung modifiziert, nach The Sheep Brain Atlas, Michigan State University Brain Biodiversity Bank, National Science Foundation.

<https://www.msu.edu/~brains/brains/sheep/index.html>, 15.02.2012.

Links: Subkortikale weiße Substanz im frontalen Kortex: kortexnah [1] und kortexfern [2]; Corpus callosum [3]; Corona radiata [4]; Capsula interna [5]; SV: Seitenventrikel.

Rechts: CA3-Region im Hippocampus: ventraler Abschnitt [1], dorsaler Abschnitt [2]

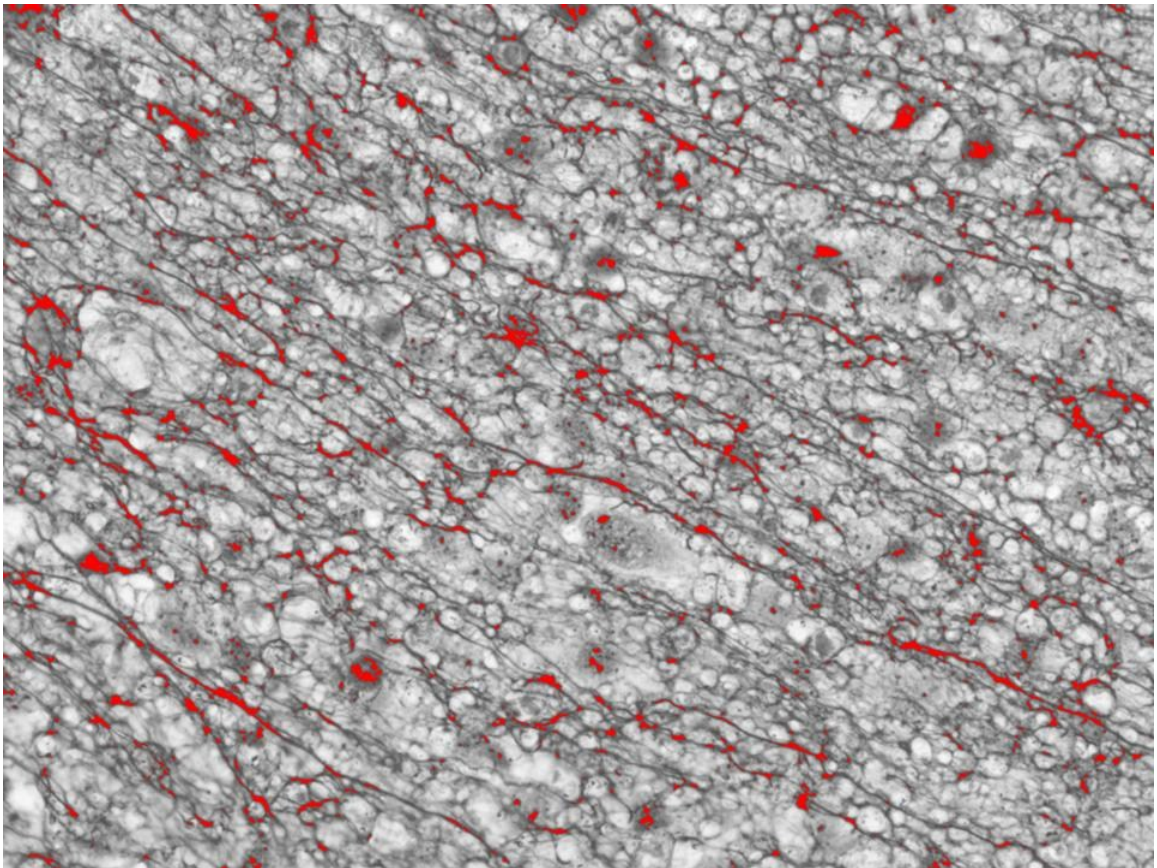
Nach der digitalen Speicherung wurden die Aufnahmen in einem Bildverarbeitungsprogramm (Scion Image 1.62 NIH, USA) ausgewertet. Zunächst wurden die Farbbilder in Schwarz-Weiß-Bilder mit 256 Graustufen umgewandelt. Mittels Bildanalyse wurde die Fläche der positiven Markierung innerhalb eines repräsentativen Ausschnittes ermittelt. Die Fläche der Immunmarkierung/Silberimprägnation spiegelt die immunhistochemische Verteilung des Antigens/Dichte der Zellfortsätze wieder. Im Vergleich zum mikroskopischen Bild wurden unter visueller Kontrolle ein oberer und ein unterer Schwellenwert festgelegt. Diese Schwellenwerte bilden eine Spanne für eine selektive Wiedergabe der positiven MBP-Immunreaktivität oder der silbern gefärbten Nervenfasern. (siehe Abb. 3.4, rote Markierung).



**Abb.3.4: Bildanalyse mit Hilfe von Grauwerten**

**A:** Mikroskopische Aufnahme: Neuronale Fortsätze in der kortexfernen subkortikalen weißen Substanz des frontalen Kortex.





**B:** Markierung der angefärbten Zellfortsätze im Graustufenbild

Im Vergleich zum mikroskopischen Bild wird im Graustufenbild ein Graubereich festgelegt (im Bild rot markiert), der dem positiven Signal der Silberimprägnation entspricht. Dieser Bereich wird durch das Bildanalyse-Programm vermessen.

### 3.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Statistikprogramm SPSS (Version 19.0) genutzt. Ziel war es eine Methode zu wählen, welche den Einfluss der Variablen „Alter der Tiere“, „Behandlung“ und deren „Interaktion“ untersucht. Da in dieser Arbeit Effekte zwischen Stress -und Kontrolltieren untersucht werden sollten, deren Mittelwerte im Alter um bis zu  $\pm 5$  Tage voneinander abwichen, wurde die multivariate lineare Regression zur Auswertung der Daten gewählt. Deren Vorteil ist es, den Einfluss des Alters (natürliche Entwicklung der neuronalen Strukturen mit zunehmendem Gestationsalter) und den Einfluss von Stress getrennt zu betrachten. Dieses ermöglichte einen Vergleich zweier Gruppen, trotz vorhandener Abweichungen im Gestationsalter der Tiere. Die Messergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (MW  $\pm$  SEM) angegeben. Die Hypothese über die Normalverteilung der studentisierten Residuen (Differenz zwischen den beobachteten Werten der abhängigen Variablen und den aus dem Modell errechneten Schätz- oder Vorhersagewerten) wurde in keiner der untersuchten Hirnregionen abgelehnt, sodass sich dieses Modell zuverlässig anwenden lässt.

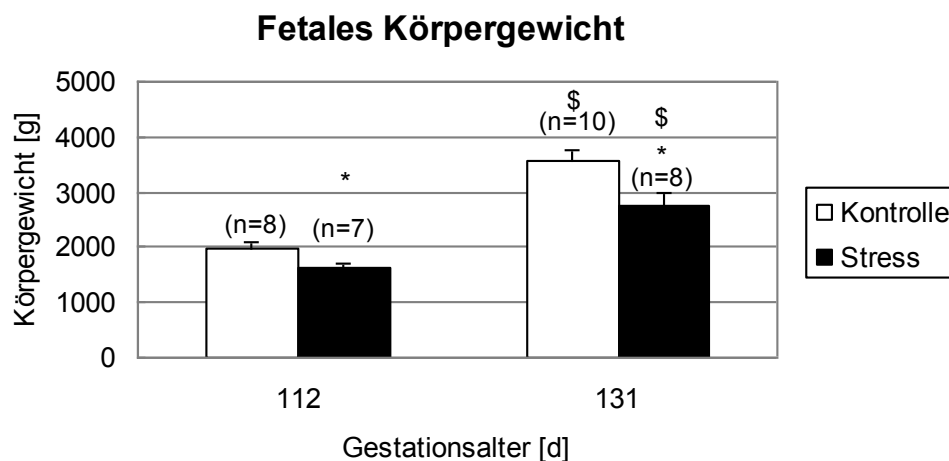
Die Messergebnisse zu den Körper- und Hirngewichten der Tiere sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (MW  $\pm$  SEM) angegeben und wurden mit einem nicht-parametrischen Test für unabhängige Stichproben nach Mann-Whitney auf Signifikanz geprüft. Das Signifikanzniveau wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  angenommen. Da die untersuchten Parameter über die Zeit betrachtet wurden, ergab sich eine Mehrfachtestung (zwischen den Tiergruppen bzw. innerhalb einer Versuchsgruppe). Um das multiple Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  einzuhalten, wurde das Korrekturverfahren von Holm verwendet (Kang et al. 2009).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Körpergewicht und Hirngewicht nach pränatalem Stress

#### Körpergewicht:

Versuchstiere, welche vom 30. bis 100. GT durch Isolation gestresst wurden, wiesen im Alter von 112 und 131 GT ein niedrigeres Körpergewicht auf als die Feten der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ , Abb.4.1). Im Vergleich zum 112. GT konnte in beiden Gruppen eine Zunahme des Körpergewichtes am 131. GT beobachtet werden ( $p < 0,05$ ; Abb.4.1). Insgesamt war die Anzahl der Zwillingssträchtigkeiten in beiden Gruppen gleich verteilt.



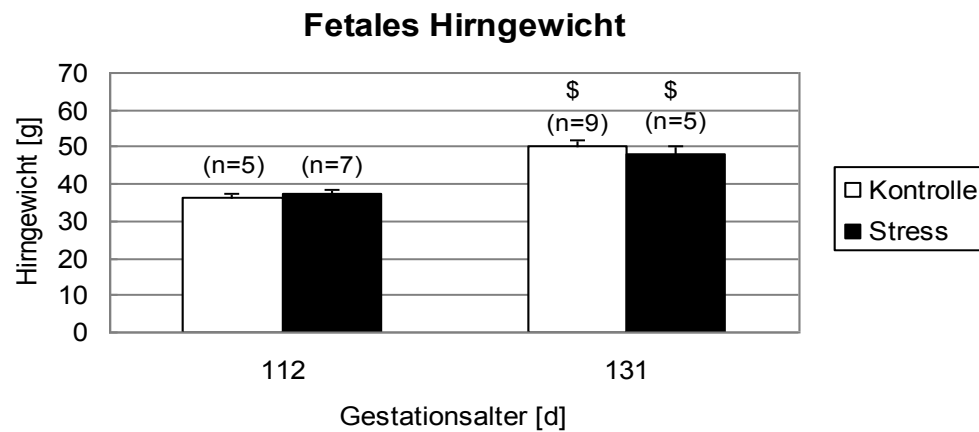
**Abb.4.1:** Fetales Körpergewicht

MW± SEM; \*  $p < 0,05$  im Vergleich zu der Kontrollgruppe;  
<sup>\$</sup>  $p < 0,05$  im Vergleich zum 112. GT.

Hirngewicht:

Feten der Stress- und Kontrollgruppe verzeichneten im Vergleich zum 112. GT eine Zunahme des Hirngewichtes am 131. GT ( $p < 0,05$ ; Abb. 4.2).

Das in dieser Arbeit angewandte Stressmodell hatte keinen Effekt auf das fetale Hirngewicht am 112. und 131. GT (Abb. 4.2).



**Abb.4.2:** Fetales Hirngewicht

MW±SEM; \$  $p < 0,05$  im Vergleich zum 112. GT.

## 4.2 Zerebrale Effekte von pränatalem Stress

### 4.2.1 Ausbildung neuronaler Fortsätze in der weißen Substanz

#### 4.2.1.1 Subkortikale weiße Substanz

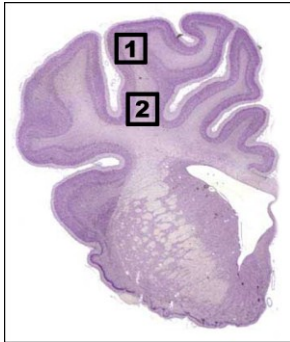


Abb. 4.3: Lokalisation der untersuchten Hirnregionen im frontalen Kortex.

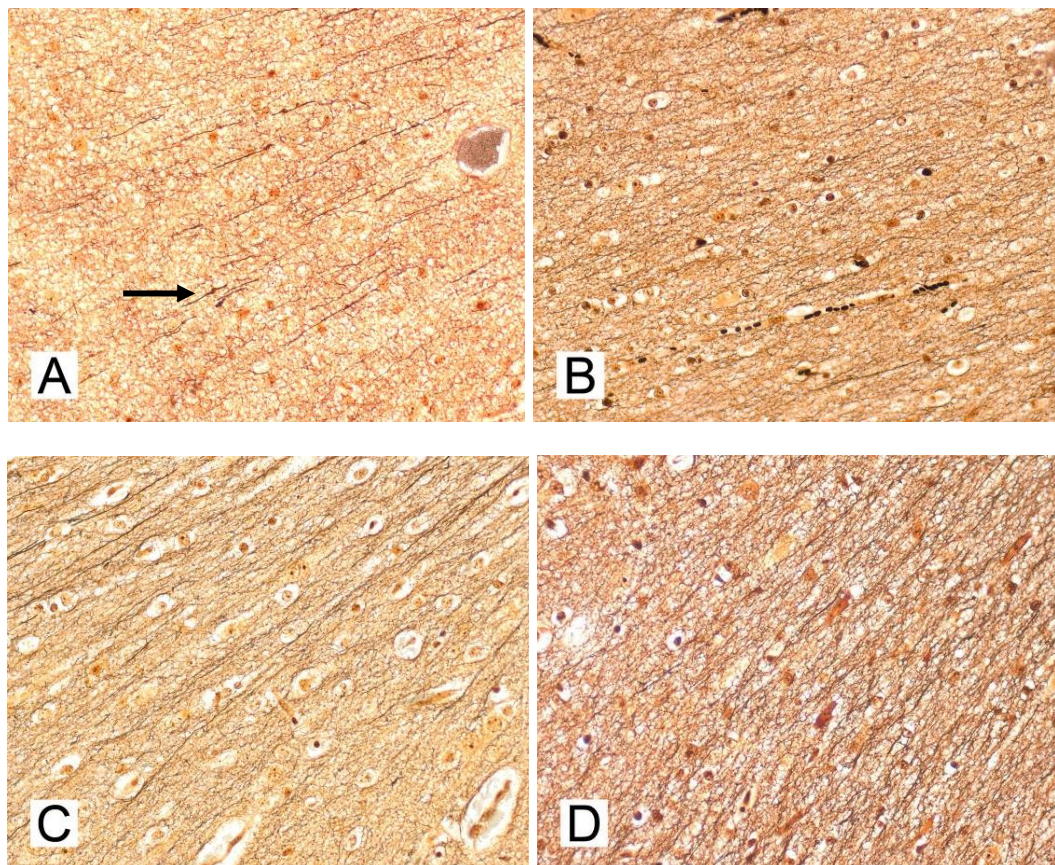
Um die Effekte von pränatalem Stress in der subkortikalen weißen Substanz zu untersuchen, wählten wir zwei repräsentative Regionen im frontalen Kortex, kortexnah (oberflächennaher Bereich, unterhalb der kortikalen Schicht VI eines Gyrus cerebri) und kortexfern (subkortikale weiße Substanz in Sulcusnähe) (Abb. 4.3).

#### Kortexnah

Einfluss des Alters: Zwischen dem 110. und 130. GT nahm die Dichte der neuronalen Fortsätze bei den Feten der Kontroll- und Stressgruppe zu ( $p < 0,001$ ; Abb. 4.4 und 4.5).

Einfluss von Stress: Am 110. und 130. GT bestand kein Unterschied in der Ausprägung der neuronalen Fortsätze zwischen der Stress- und Kontrollgruppe, (Abb. 4.4, 4.5 und Tab.4.1).

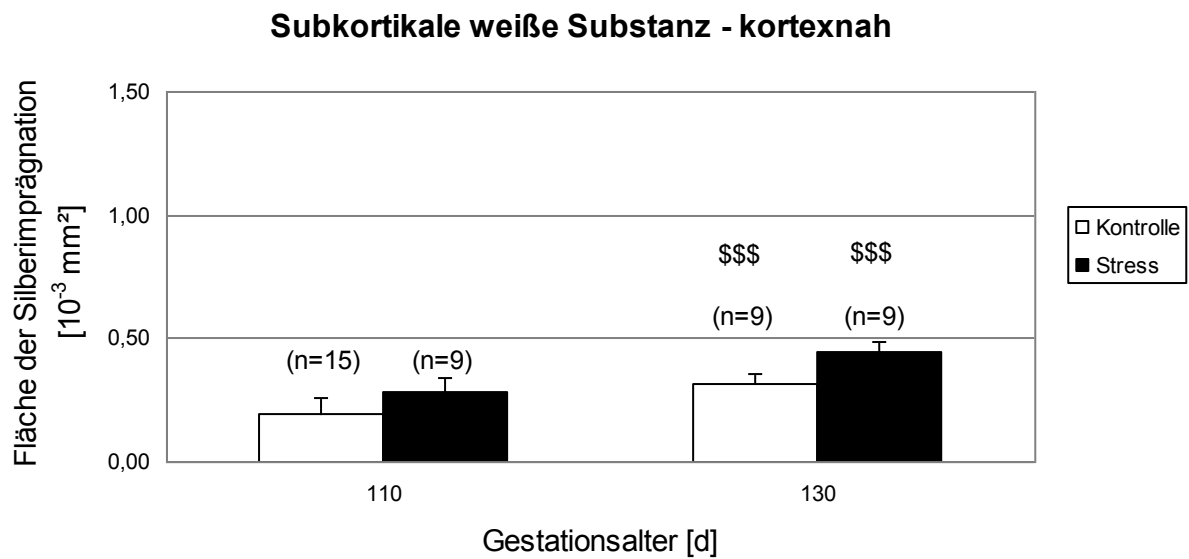




**Abb.4.4:** Mikrofotografien der neuronalen Fortsätze in der kortexnahen subkortikalen weißen Substanz des frontalen Kortex. Silberimprägnation.  
 → Neuronaler Fortsatz

A: Kontrolltier am 110. Gestationstag  
 C: Kontrolltier am 130. Gestationstag

B: Stresstier am 110. Gestationstag  
 D: Stresstier am 130. Gestationstag



**Abb.4.5:** Effekte von Alter und Stress auf die Dichte neuronaler Fortsätze in der kortexnahen subkortikalen weißen Substanz des frontalen Kortex.

MW±SEM; \*\*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zum 110. GT.

Multivariate lineare Regression: Signifikanzprüfung der Einflussvariablen

Gruppe	Gestationsalter	Interaktion zwischen
-Stress/Kontrolle	-Stress/Kontrolle	-Gruppe und Alter
0,851	0,000	0,459

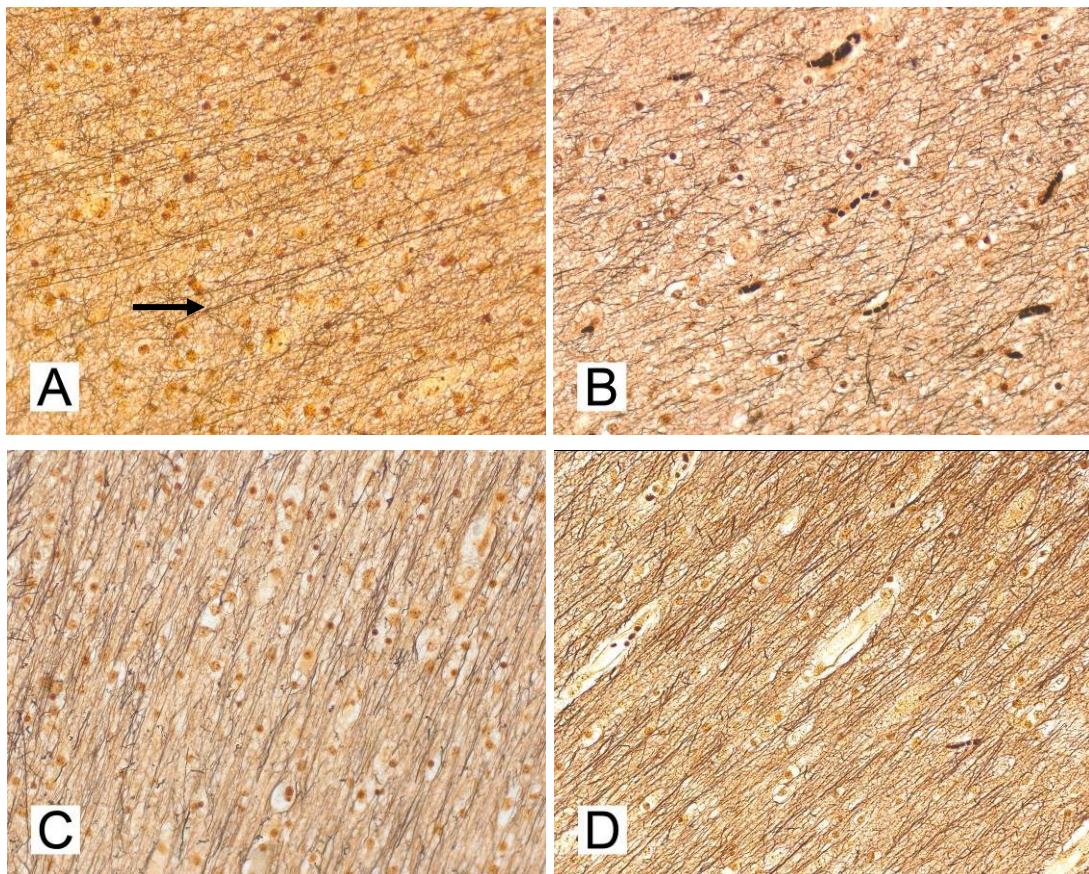
**Tab.4.1:** Ergebnisse der multivariaten linearen Regression bzgl. der Effekte von Alter und Stress auf die Dichte neuronaler Fortsätze in der kortexnahen subkortikalen weißen Substanz.



### Kortexfern

Einfluss des Alters: Bei den Feten beider Gruppen zeigte sich mit zunehmendem Alter eine höhere Dichte neuronaler Fortsätze ( $p < 0,001$ ; Abb. 4.6 und 4.7).

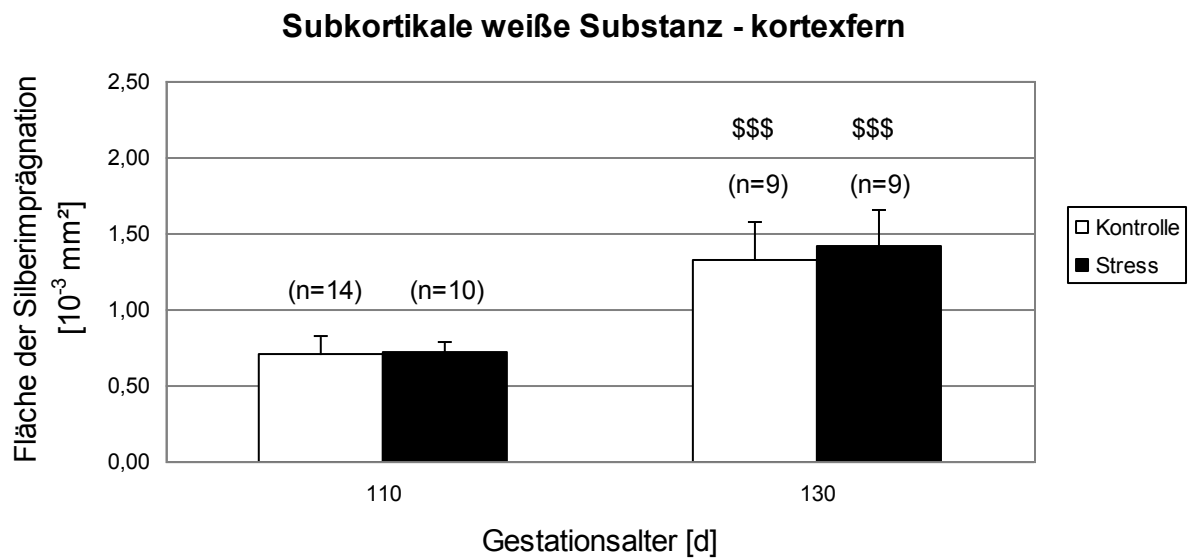
Einfluss von Stress: Kontroll- und Stressgruppe wiesen zu keinem der untersuchten Gestationszeitpunkte Unterschiede in der Dichte neuronaler Fortsätze auf (Abb. 4.6, 4.7 und Tab.4.2).



**Abb.4.6:** Mikrofotografien der neuronalen Fortsätze in der kortexfernen subkortikalen weißen Substanz des frontalen Kortex. Silberimprägnation.  
 ➔ Neuronaler Fortsatz

A: Kontrolltier am 110. Gestationstag  
 C: Kontrolltier am 130. Gestationstag

B: Stresstier am 110. Gestationstag  
 D: Stresstier am 130. Gestationstag



**Abb.4.7:** Effekte von Alter und Stress auf die Dichte neuronaler Fortsätze in der kortexfernen subkortikalen weißen Substanz des frontalen Kortex.

MW±SEM; \*\*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zum 110. GT.

#### Multivariate lineare Regression: Signifikanzprüfung der Einflussvariablen

Gruppe	Gestationsalter	Interaktion zwischen
-Stress/Kontrolle	-Stress/Kontrolle	-Gruppe und Alter
0,945	0,000	0,960

**Tab.4.2:** Ergebnisse der multivariaten linearen Regression bzgl. der Effekte von Alter und Stress auf die Dichte neuronaler Fortsätze in der kortexfernen subkortikalen weißen Substanz.



### 4.2.1.2 Corpus callosum

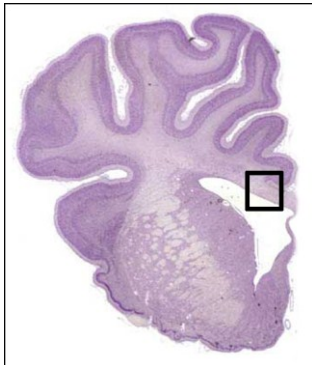
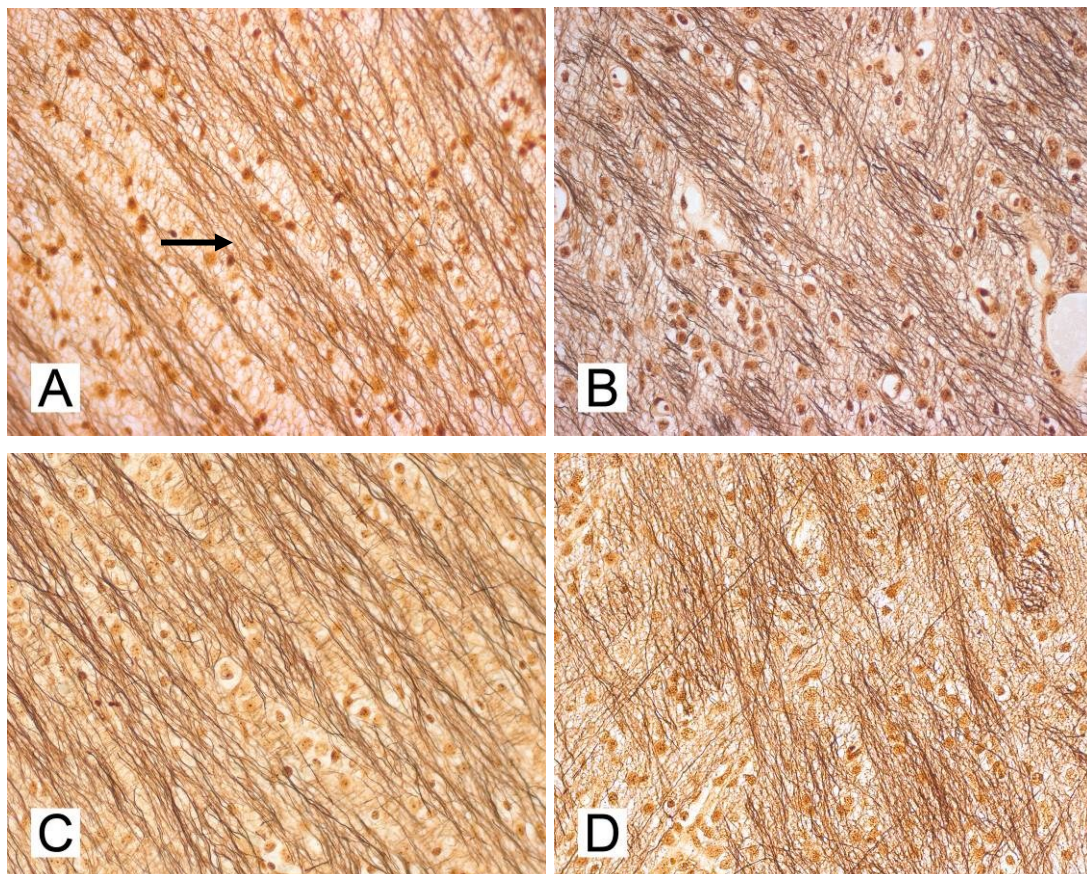


Abb. 4.8: Lokalisation der untersuchten Hirnregion im Corpus callosum.

Das Corpus callosum gehört zur weißen Substanz. In ihm verlaufen Nervenfasern, welche die beiden Hemisphären verbinden.

Einfluss des Alters: Bei den Feten der Kontroll- und Stressgruppe nahm die Anzahl neuronaler Fortsätze, welche sich durch die Silberimprägnation anfärben ließen, zwischen dem 110. und 130. GT zu ( $p < 0,05$ ; Abb. 4.9 und 4.10).

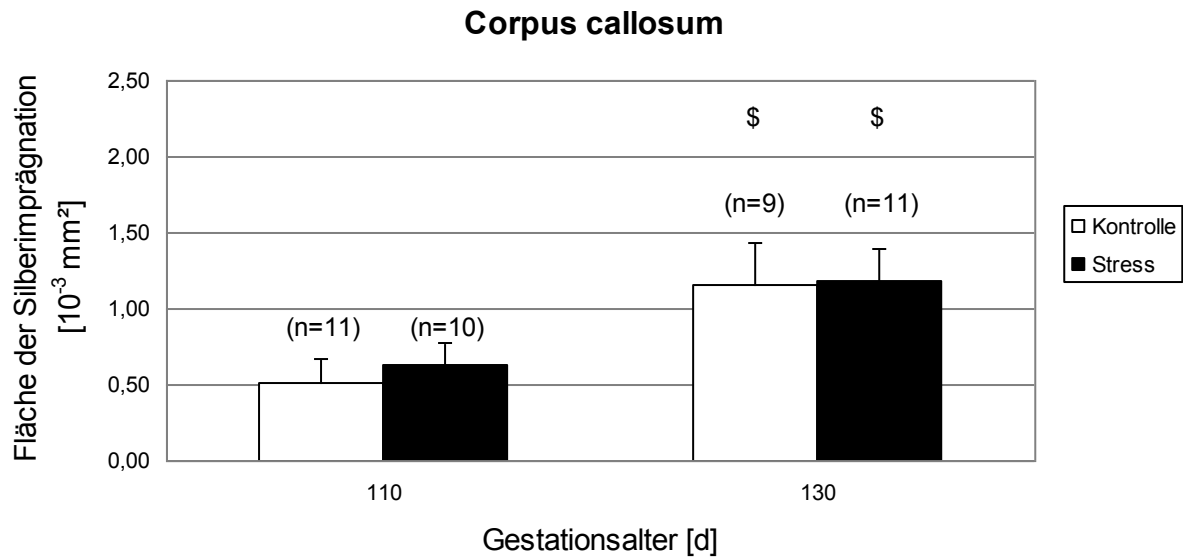
Einfluss von Stress: Pränataler Stress vom 30.-100. GT hatte keinen Effekt auf die Dichte neuronaler Fortsätze am 110. und 130. GT in dieser Hirnregion (Abb. 4.9, 4.10 und Tab. 4.3).



**Abb.4.9:** Mikrofotografien der neuronalen Fortsätze im Corpus callosum. Silberimprägnation. ➔ Neuronale Fortsätze

A: Kontrolltier am 110. Gestationstag  
C: Kontrolltier am 130. Gestationstag

B: Stresstier am 110. Gestationstag  
D: Stresstier am 130. Gestationstag



**Abb.4.10:** Effekte von Alter und Stress auf die Dichte neuronaler Fortsätze im Corpus callosum.

MW±SEM. \$ p<0,05 im Vergleich zum 110. GT.

#### Multivariate lineare Regression: Signifikanzprüfung der Einflussvariablen

Gruppe	Gestationsalter	Interaktion zwischen
-Stress/Kontrolle	-Stress/Kontrolle	-Gruppe und Alter
0,327	0,001	0,382

**Tab.4.3:** Ergebnisse der multivariaten linearen Regression bzgl. der Effekte von Alter und Stress auf die Dichte neuronaler Fortsätze im Corpus callosum.



### 4.2.1.3 Tiefe weiße Substanz – Corona radiata

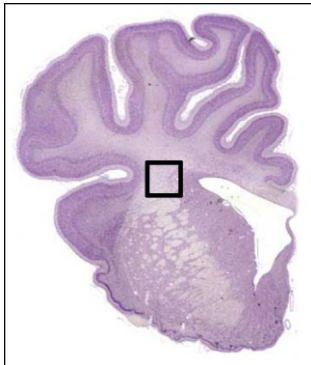


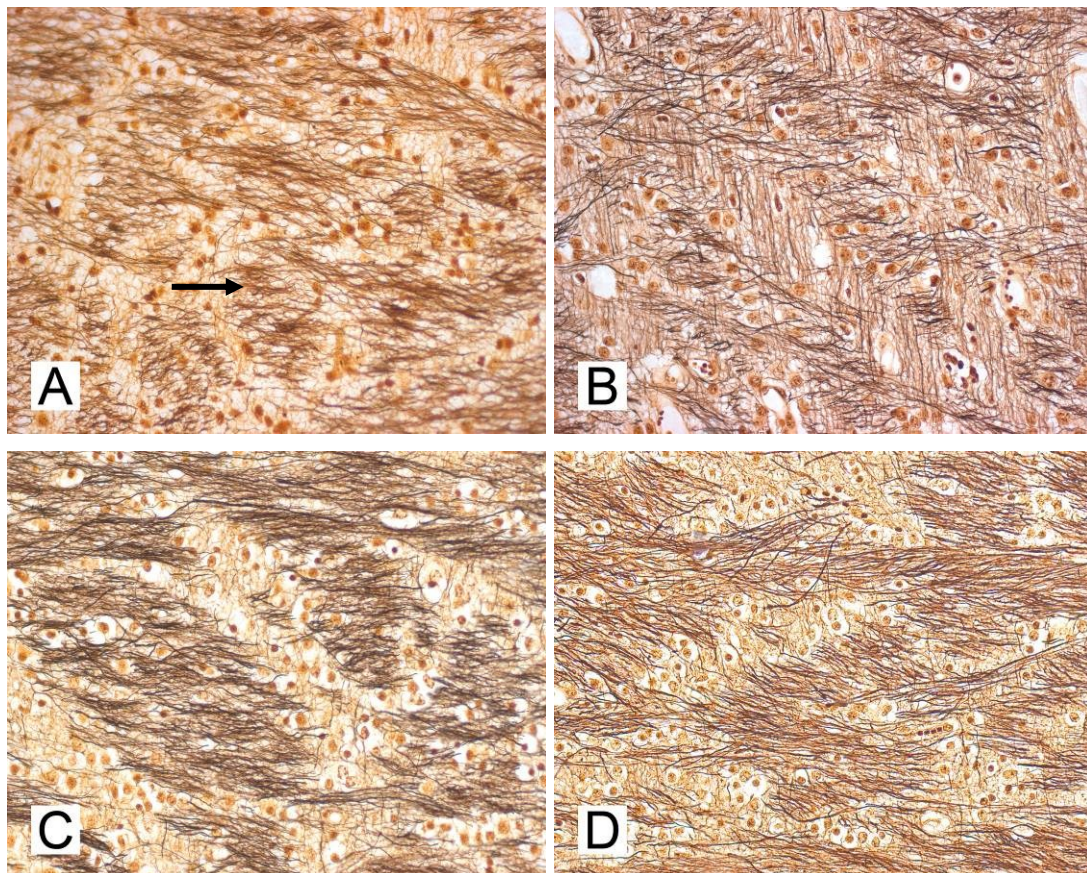
Abb. 4.11: Lokalisation der untersuchten Hirnregion in der Corona radiata.

Die Nervenfasern der Corona radiata ziehen in absteigender Richtung vom frontalen Kortex zur Capsula interna.

Sie gehören zum tiefen Marklager.

Einfluss des Alters: Die Feten der Kontroll- und Stressgruppe wiesen am 130. GT eine höhere Dichte neuronaler Fortsätze auf als am 110. GT ( $p < 0,001$ ; Abb. 4.12 und 4.13).

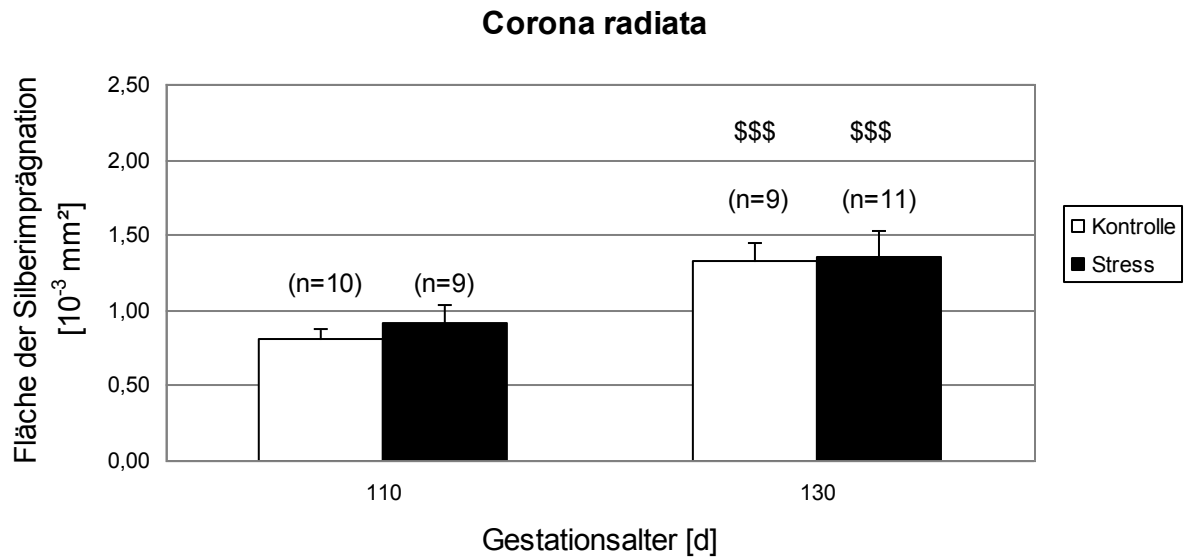
Einfluss von Stress: Feten deren Mütter zwischen dem 30.-100. GT der Isolation ausgesetzt waren, zeigten im Vergleich zu der Kontrollgruppe keine unterschiedliche Ausprägung neuronaler Fortsätze (Abb. 4.12, 4.13 und Tab.4.4).



**Abb.4.12:** Mikrofotografien der neuronalen Fortsätze in der Corona radiata. Silberimprägnation. ➔ Neuronale Fortsätze

A: Kontrolltier am 110. Gestationstag  
C: Kontrolltier am 130. Gestationstag

B: Stresstier am 110. Gestationstag  
D: Stresstier am 130. Gestationstag



**Abb.4.13:** Effekte von Alter und Stress auf die Dichte neuronaler Fortsätze in der Corona radiata.

MW±SEM. \$\$\$  $p < 0,001$  im Vergleich zum 110. GT.

#### Multivariate lineare Regression: Signifikanzprüfung der Einflussvariablen

Gruppe	Gestationsalter	Interaktion zwischen
-Stress/Kontrolle	-Stress/Kontrolle	-Gruppe und Alter
0,123	0,000	0,169

**Tab.4.4:** Ergebnisse der multivariaten linearen Regression bzgl. der Effekte von Alter und Stress auf die Dichte neuronaler Fortsätze in der Corona radiata.



#### 4.2.1.4 Capsula interna

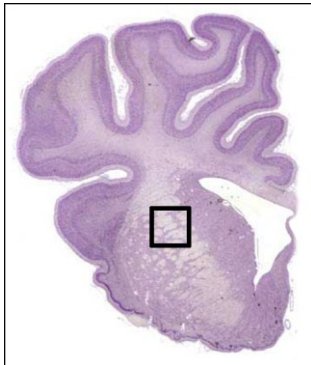
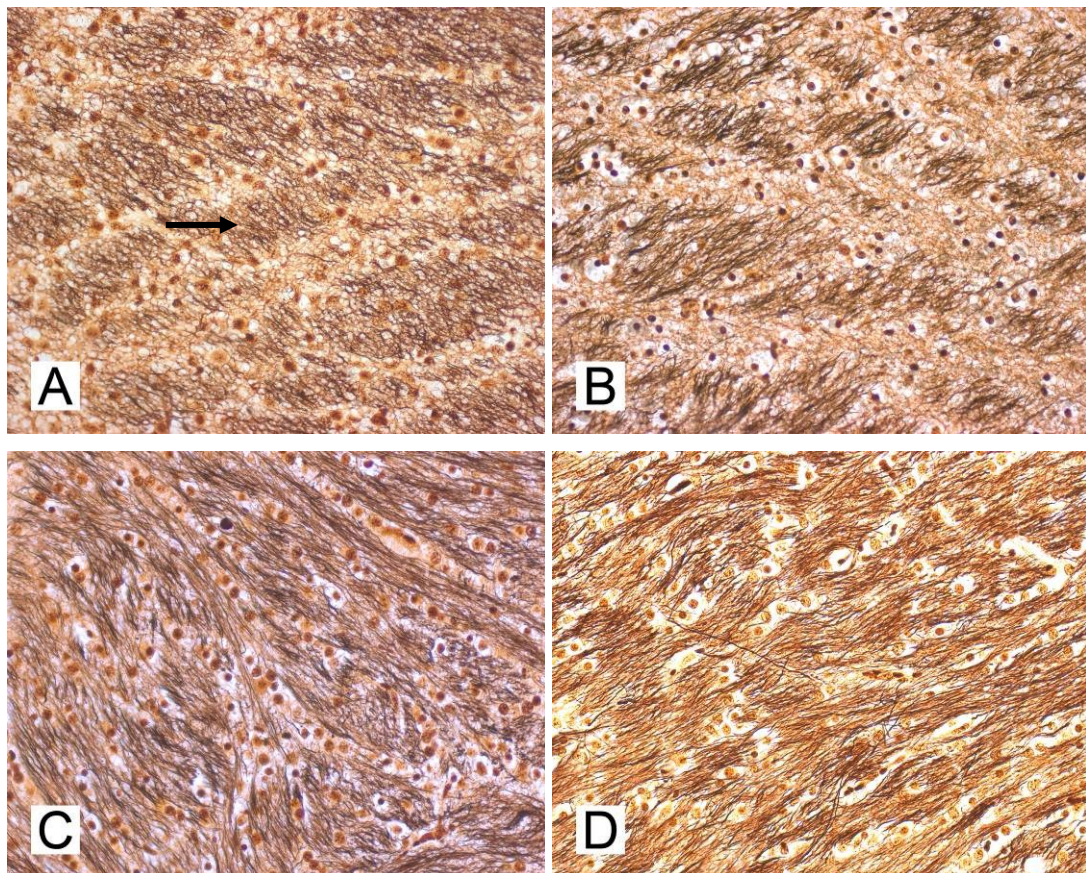


Abb. 4.14: Lokalisation der untersuchten Hirnregion in der Capsula interna.

Die Capsula interna enthält wichtige Nervenbahnen die von der Großhirnrinde zu tiefer gelegenen Strukturen ziehen (z.B. Pyramidenbahn) und ist Bestandteil der weißen Substanz (Abb. 4.14).

Einfluss des Alters: Im Vergleich zum 110. GT konnte bei den Feten der Kontroll- und Stressgruppe am 130. GT ein Zuwachs an Nervenfortsätzen verzeichnet werden (p<0,001; Abb. 4.15 und 4.16).

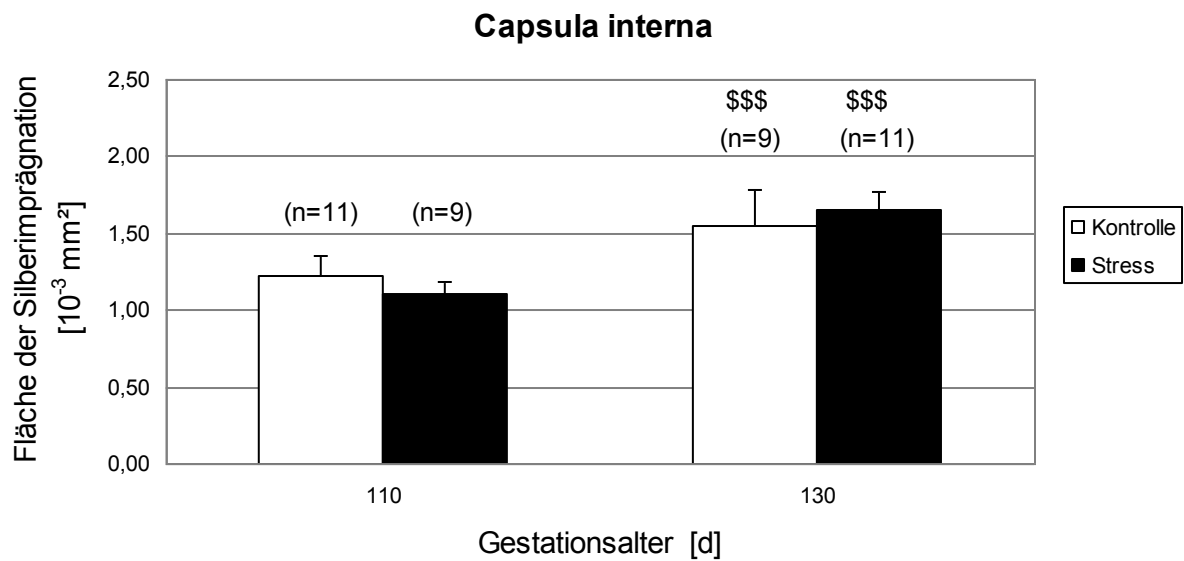
Einfluss von Stress: Pränataler Stress zwischen dem 30. und 100. GT hatte keinen Effekt auf die Dichte neuronaler Fortsätze in der Capsula interna (Abb. 4.15, 4.16 und Tab.4.5).



**Abb.4.15:** Mikrofotografien der neuronalen Fortsätze in der Capsula interna. Silberimprägnation. ➔ Neuronale Fortsätze

A: Kontrolltier am 110. Gestationstag  
C: Kontrolltier am 130. Gestationstag

B: Stresstier am 110. Gestationstag  
D: Stresstier am 130. Gestationstag



**Abb.4.16:** Effekte von Alter und Stress auf die Dichte neuronaler Fortsätze in der Capsula interna.

MW±SEM. \$\$\$  $p < 0,001$  im Vergleich zum 110. GT.

#### Multivariate lineare Regression: Signifikanzprüfung der Einflussvariablen

Gruppe	Gestationsalter	Interaktion zwischen
-Stress/Kontrolle	-Stress/Kontrolle	-Gruppe und Alter
0,304	0,000	0,281

**Tab.4.5:** Ergebnisse der multivariaten linearen Regression bzgl. der Effekte von Alter und Stress auf die Dichte neuronaler Fortsätze in der Capsula interna.

## **4.2.2 Myelinisierung neuronaler Fortsätze in der weißen Substanz**

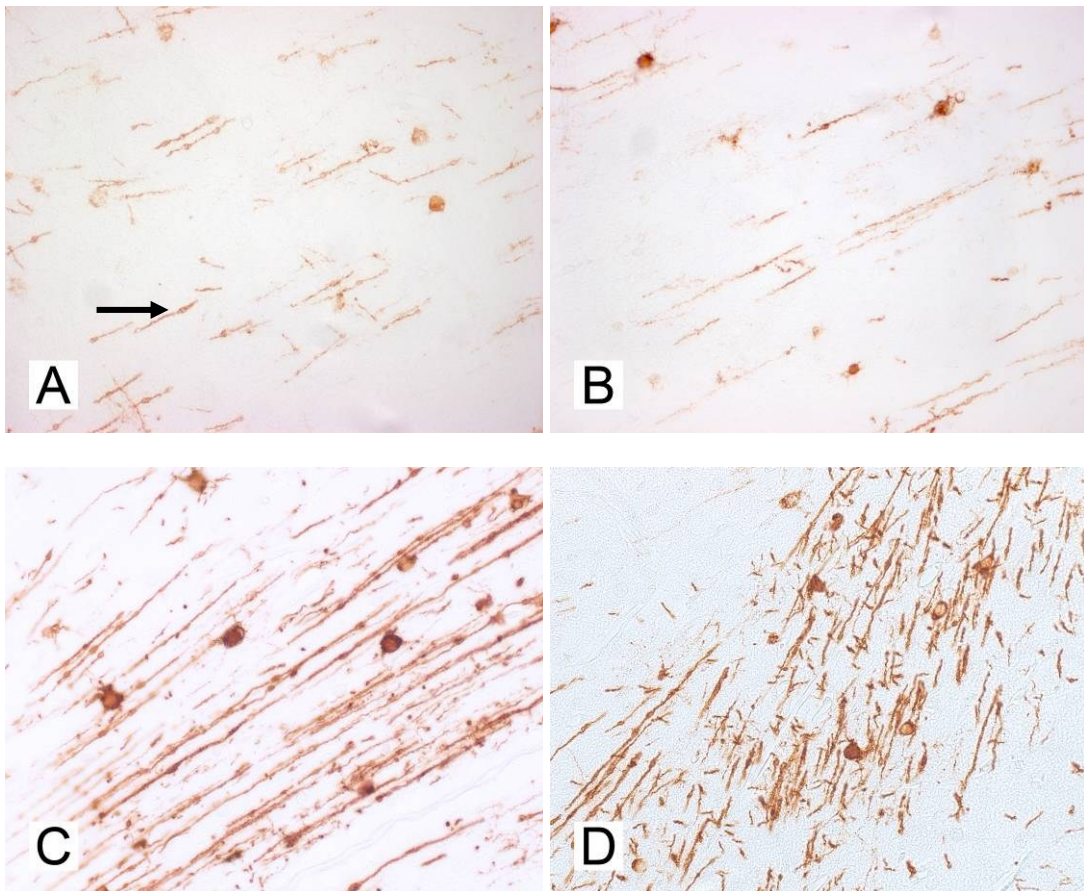
Der Nachweis von MBP, einem wichtigen Bestandteil der Myelinscheide, diente als Korrelat für den Fortgang der Myelinisierung von Nervenfasern im ZNS. In der vorliegenden Arbeit wurde MBP in der subkortikalen weißen Substanz, dem Corpus callosum, der Corona radiata und der Capsula interna untersucht.

### **4.2.2.1 Subkortikale weiße Substanz**

#### Kortexnah und Kortexfern

Einfluss des Alters: Im Vergleich zum 110. GT wiesen die Feten der Kontroll- und Stressgruppe am 130. GT eine höhere MBP-Immunreaktivität auf ( $p < 0,001$ ; Abb. 4.17, Abb. 4.18, Abb. 4.19 und Abb. 4.20).

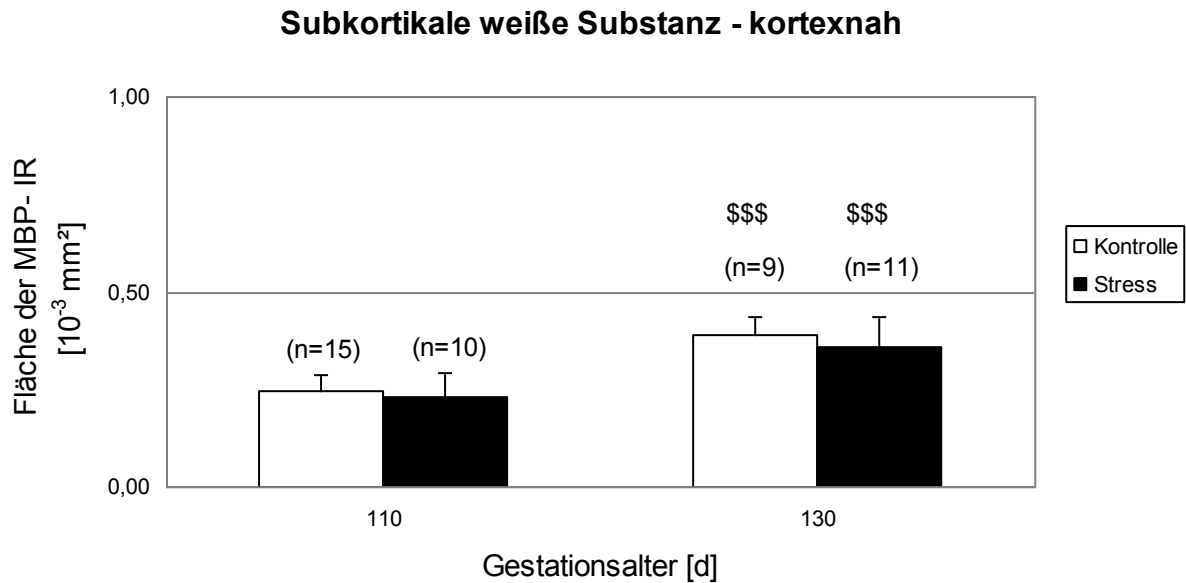
Einfluss von Stress: Chronischer Stress während der Schwangerschaft zwischen dem 30. und 100. GT beeinflusste weder am 110. noch am 130. GT die Myelinisierung, (Abb. 4.17, Abb. 4.18, Abb. 4.19, Abb. 4.20, Tab. 4,6 und Tab 4,7).



**Abb.4.17:** Mikrofotografien der neuronalen Fortsätze in der kortexnahen subkortikalen weißen Substanz des frontalen Kortex. Immunhistochemischer Nachweis von MBP. → Neuronaler Fortsatz

A: Kontrolltier am 110. Gestationstag  
C: Kontrolltier am 130. Gestationstag

B: Stresstier am 110. Gestationstag  
D: Stresstier am 130. Gestationstag



**Abb.4.18:** Effekte von Alter und Stress auf die Myelinisierung der neuronalen Fortsätze in der kortexnahen subkortikalen weißen Substanz des frontalen Kortex.

MW±SEM. \*\*\*  $p < 0,001$  im Vergleich zum 110. GT.

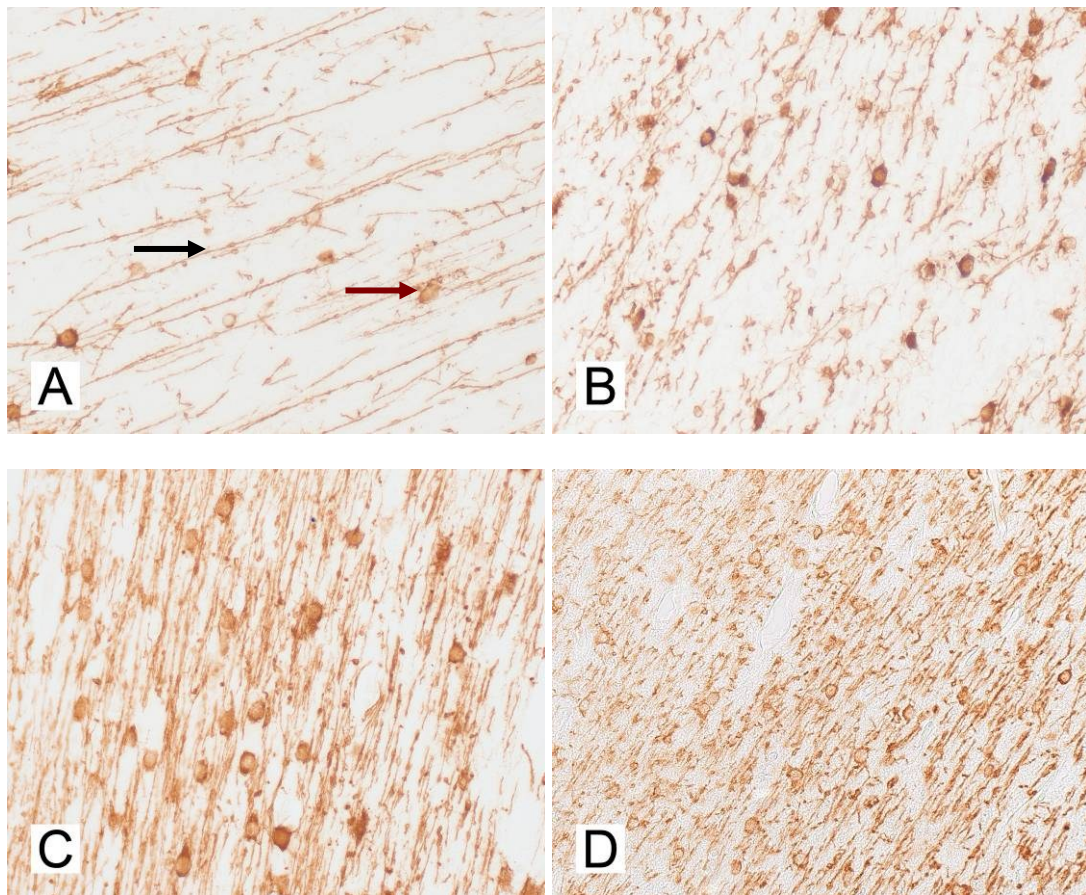
#### Multivariate lineare Regression: Signifikanzprüfung der Einflussvariablen

Gruppe	Gestationsalter	Interaktion zwischen
-Stress/Kontrolle	-Stress/Kontrolle	-Gruppe und Alter
0,733	0,000	0,716

**Tab.4.6** Ergebnisse der multivariaten linearen Regression bzgl. der Effekte von Alter und Stress auf die Myelinisierung neuronaler Fortsätze in der kortexnahen subkortikalen weißen Substanz.



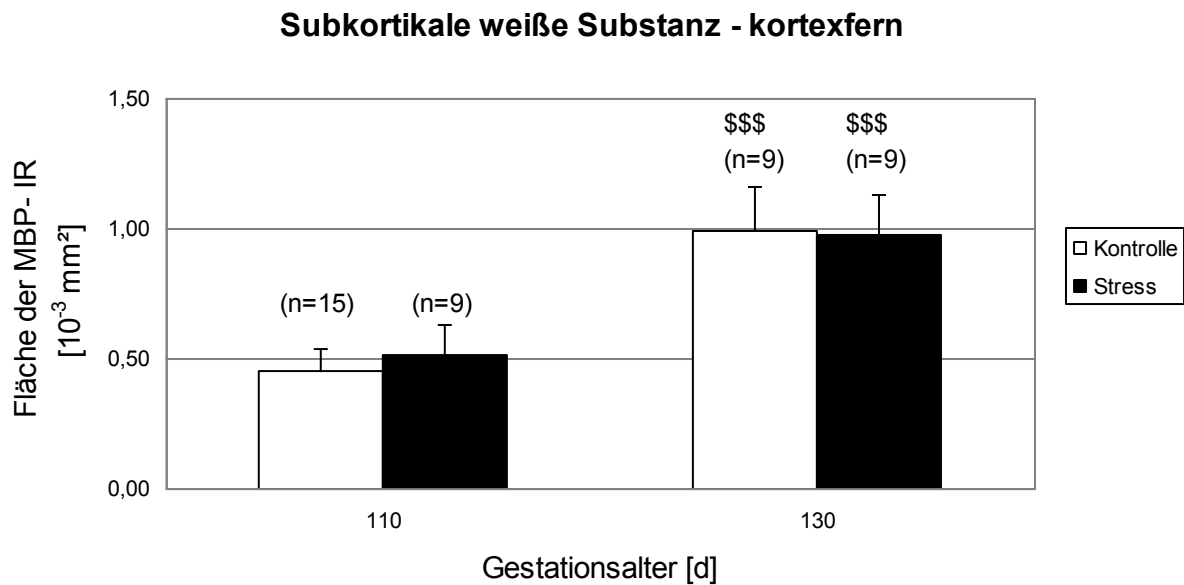
Zellkörper und Nervenfortsätze in der kortexfernen subkortikalen weißen Substanz sind deutlich MBP-positiv markiert (Abb. 4.19).



**Abb.4.19:** Mikrofotografien der neuronalen Fortsätze in der kortexfernen subkortikalen weißen Substanz des frontalen Kortex. Immunhistochemischer Nachweis von MBP. → Neuronaler Fortsatz → Zellkörper

A: Kontrolltier am 110. Gestationstag  
C: Kontrolltier am 130. Gestationstag

B: Stresstier am 110. Gestationstag  
D: Stresstier am 130. Gestationstag



**Abb.4.20:** Effekte von Alter und Stress auf die Myelinisierung der neuronalen Fortsätze in der kortexfernen subkortikalen weißen Substanz des frontalen Kortex.

MW±SEM. \$\$\$  $p < 0,001$  im Vergleich zum 110. GT.

#### Multivariate lineare Regression: Signifikanzprüfung der Einflussvariablen

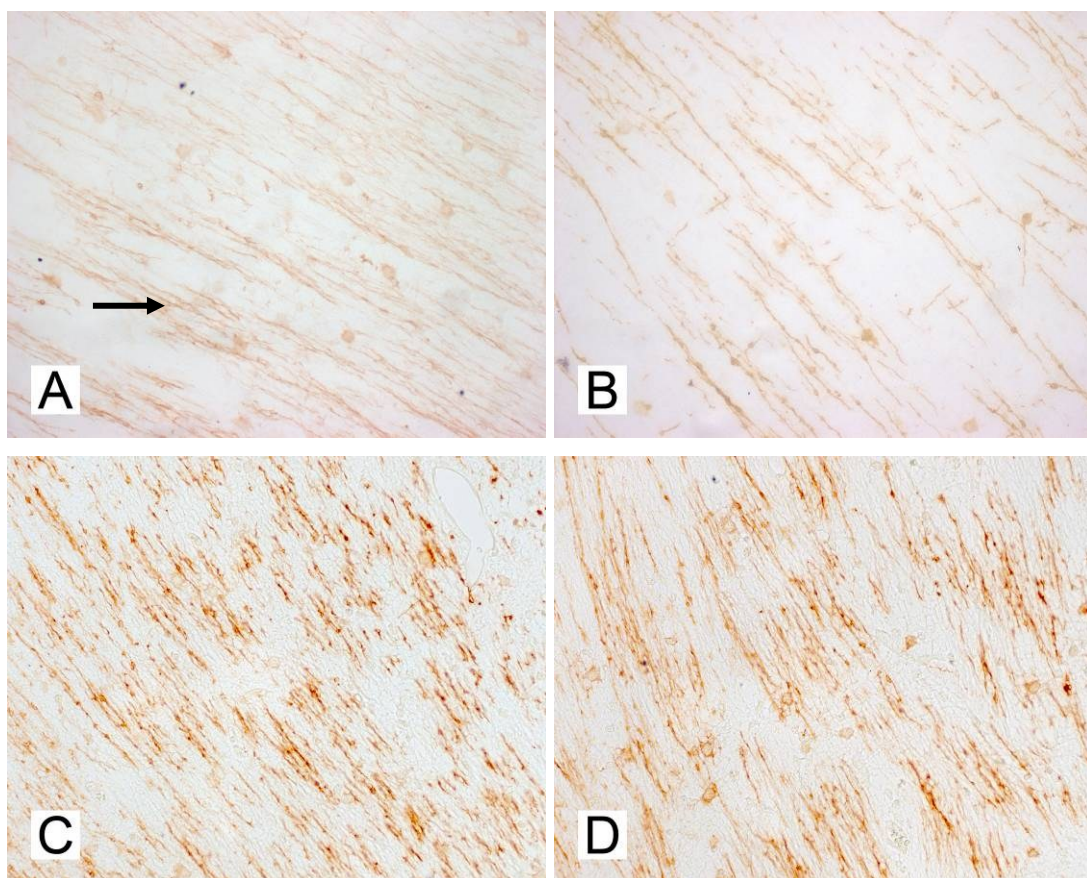
Gruppe	Gestationsalter	Interaktion zwischen
-Stress/Kontrolle	-Stress/Kontrolle	-Gruppe und Alter
0,208	0,000	0,265

**Tab.4.7:** Ergebnisse der multivariaten linearen Regression bzgl. der Effekte von Alter und Stress auf die Myelinisierung neuronaler Fortsätze in der kortexfernen subkortikalen weißen Substanz.

#### 4.2.2.2 Corpus callosum

Einfluss des Alters: Im Vergleich zum 110. GT wiesen die Tiere der Kontroll- und Stressgruppe am 130. GT eine höherer Expression von MBP im Corpus callosum auf ( $p < 0,05$ ; Abb. 4.21 und Abb. 4.22).

Einfluss von Stress: Quantitativ gab es keine Unterschiede in der MBP-Immunreaktivität zwischen den Feten der Kontroll- und Stressgruppe, (Abb. 4.21, Abb.4.22 und Tab. 4.8).

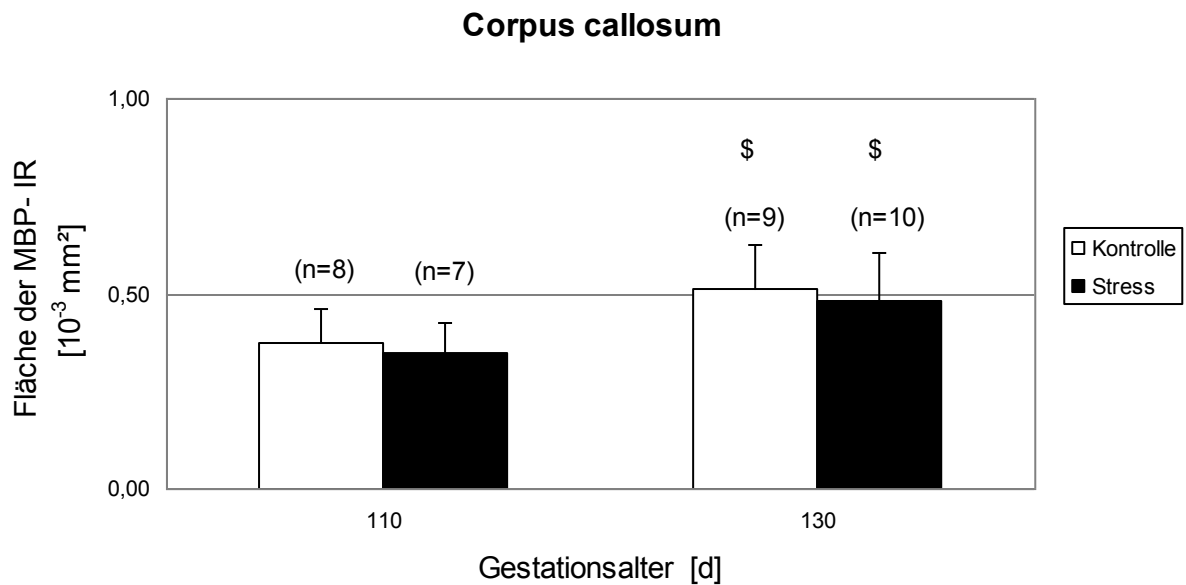


**Abb.4.21:** Mikrofotografien der neuronalen Fortsätze im Corpus callosum. Immunhistochemischer Nachweis von MBP. ➔ Neuronale Fortsätze

A: Kontrolltier am 110. Gestationstag  
C: Kontrolltier am 130. Gestationstag

B: Stresstier am 110. Gestationstag  
D: Stresstier am 130. Gestationstag





**Abb.4.22:** Effekte von Alter und Stress auf die Myelinisierung der neuronalen Fortsätze im Corpus callosum

MW±SEM. \$ p<0,05 im Vergleich zum 110. GT.

#### Multivariate lineare Regression: Signifikanzprüfung der Einflussvariablen

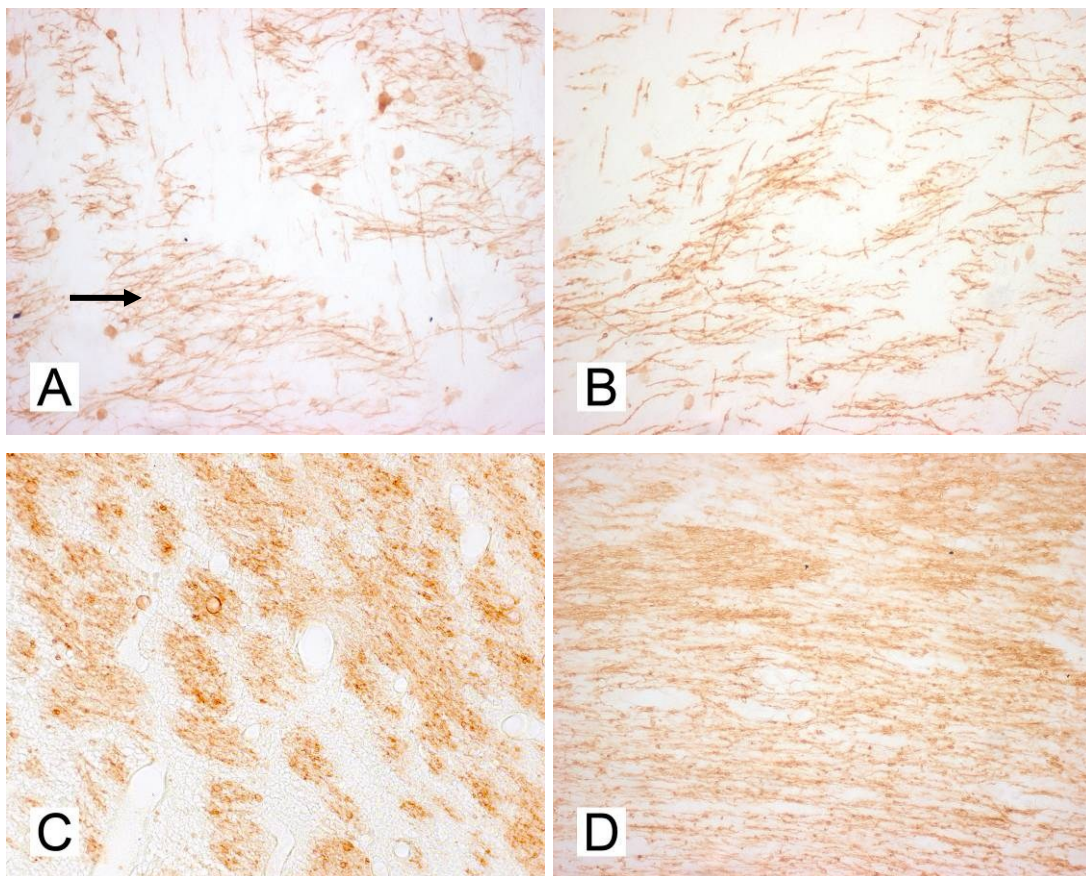
Gruppe	Gestationsalter	Interaktion zwischen
-Stress/Kontrolle	-Stress/Kontrolle	-Gruppe und Alter
0,561	0,031	0,541

**Tab.4.8:** Ergebnisse der multivariaten linearen Regression bzgl. der Effekte von Alter und Stress auf die Myelinisierung neuronaler Fortsätze im Corpus callosum.

#### 4.2.2.3 Tiefe weiße Substanz - Corona radiata

Einfluss des Alters: Im Vergleich zum 110. GT verzeichneten die Feten der Kontroll- und Stressgruppe am 130. GT eine stärkere Myelinisierung ( $p < 0,05$ ; Abb. 4.23 und Abb. 4.24).

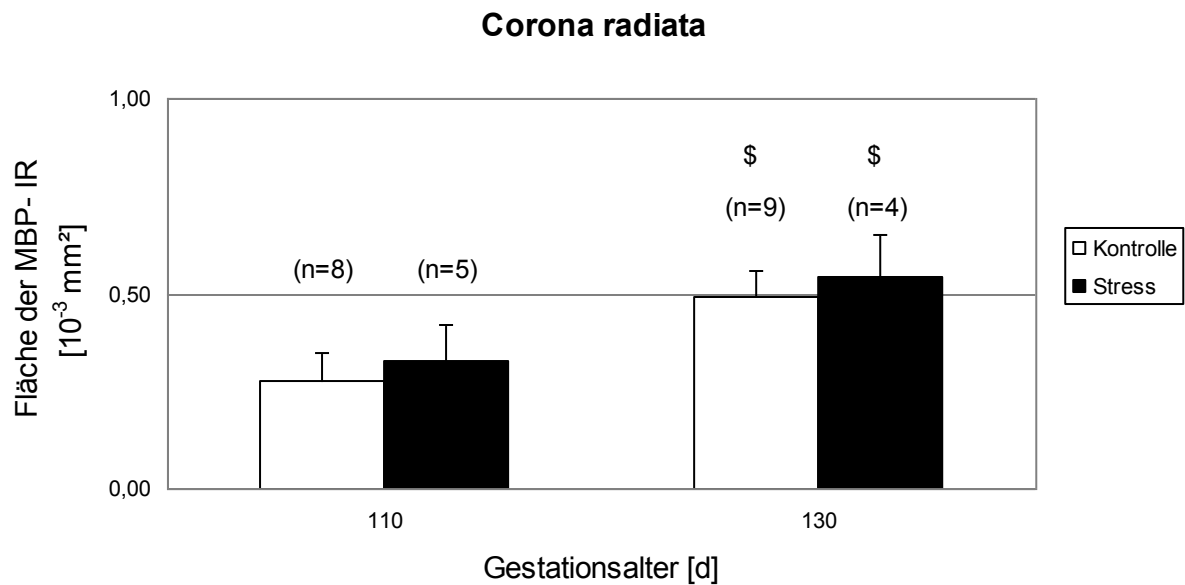
Einfluss von Stress: Pränataler Stress hatte keinen Effekt auf die Anzahl MBP-positiv markierter Nervenfasern und Zellkörper (Abb. 4.23, 4.24 und Tab.4.9).



**Abb.4.23:** Mikrofotografien der neuronalen Fortsätze in der Corona radiata. Immunhistochemischer Nachweis von MBP. → Neuronale Fortsätze

A: Kontrolltier am 110. Gestationstag  
C: Kontrolltier am 130. Gestationstag

B: Stresstier am 110. Gestationstag  
D: Stresstier am 130. Gestationstag



**Abb.4.24:** Effekte von Alter und Stress auf die Myelinisierung der neuronalen Fortsätze in der Corona radiata

MW±SEM. \$ p<0,05 im Vergleich zum 110. GT.

#### Multivariate lineare Regression: Signifikanzprüfung der Einflussvariablen

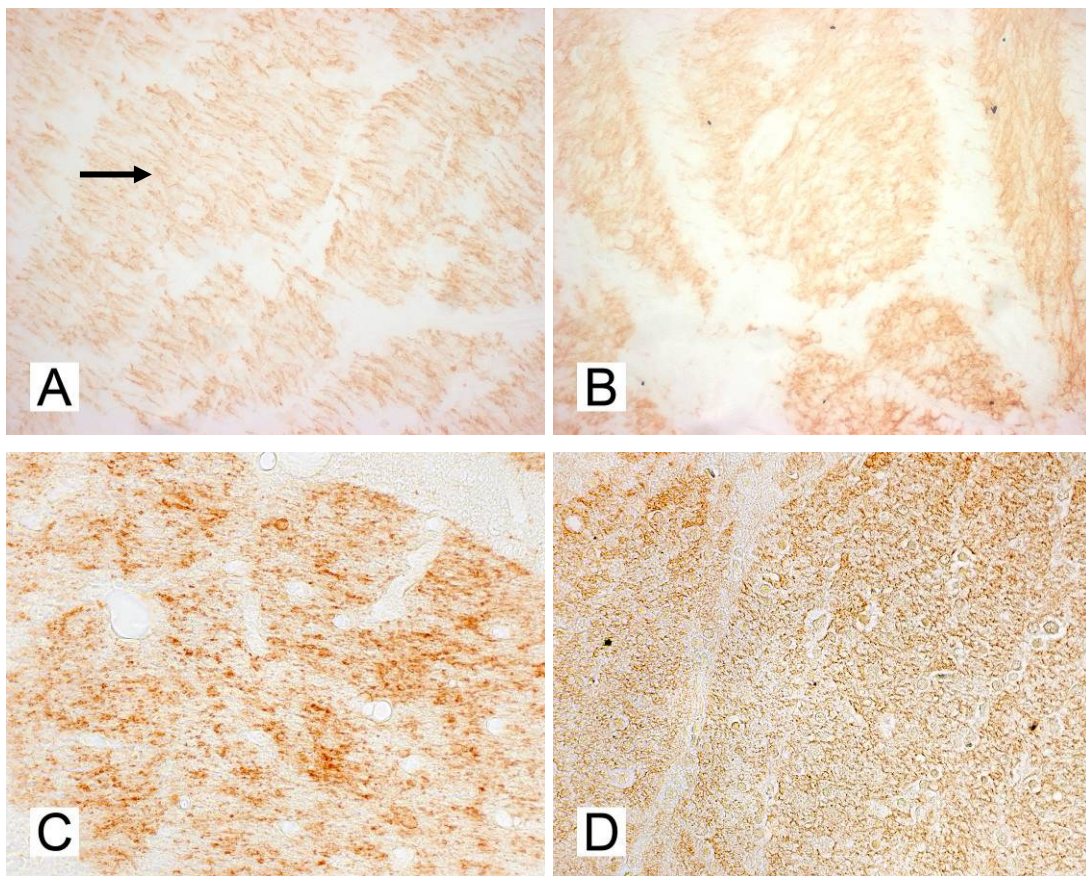
Gruppe	Gestationsalter	Interaktion zwischen
-Stress/Kontrolle	-Stress/Kontrolle	-Gruppe und Alter
0,375	0,024	0,456

**Tab.4.9:** Ergebnisse der multivariaten linearen Regression bzgl. der Effekte von Alter und Stress auf die Myelinisierung neuronaler Fortsätze in der Corona radiata.

#### 4.2.2.4 Capsula interna

Einfluss des Alters: Zwischen dem 110. und 130. GT verzeichneten die Kontrolltiere eine Zunahme der Myelinisierung ( $p < 0,05$ ; Abb. 4.25 und 4.26).

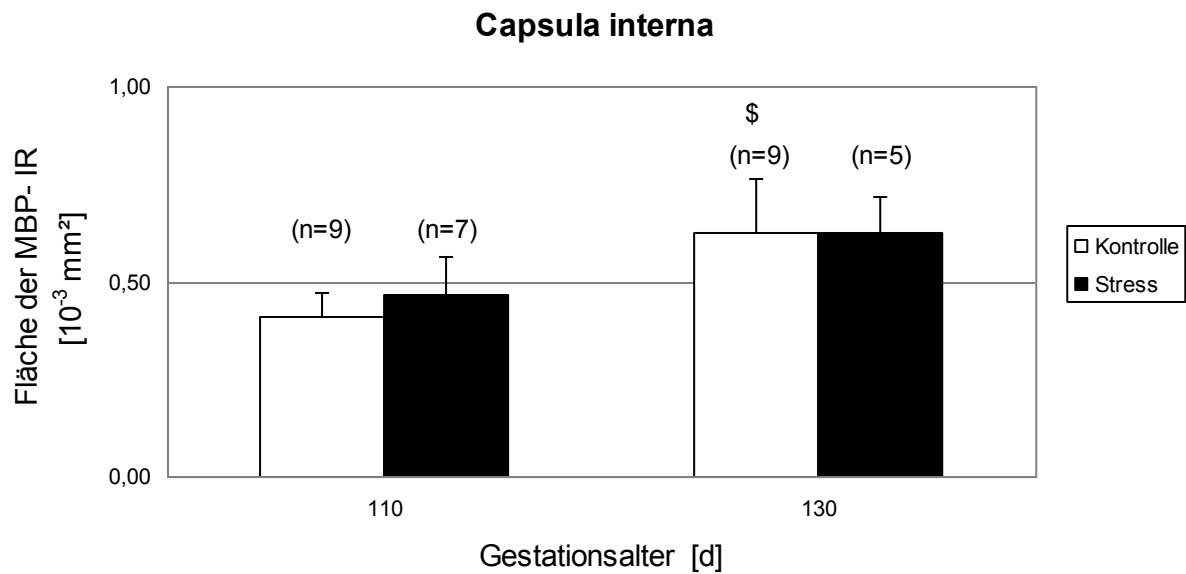
Einfluss von Stress: Pränataler Stress zwischen dem 30. und 100. GT führte weder am 110. noch am 130. GT zu akuten Effekten auf die Myelinisierung in der Capsula interna (Abb. 4.25, 4.26 und Tab.4.10).



**Abb.4.25:** Mikrofotografien der neuronalen Fortsätze in der Capsula interna. Immunhistochemischer Nachweis von MBP. → Neuronale Fortsätze

A: Kontrolltier am 110. Gestationstag  
C: Kontrolltier am 130. Gestationstag

B: Stresstier am 110. Gestationstag  
D: Stresstier am 130. Gestationstag



**Abb.4.26:** Effekte von Alter und Stress auf die Myelinisierung der neuronalen Fortsätze in der Capsula interna.

MW±SEM. \$ p<0,05 im Vergleich zum 110. GT.

#### Multivariate lineare Regression: Signifikanzprüfung der Einflussvariablen

Gruppe	Gestationsalter	Interaktion zwischen	Gestationsalter
-Stress/Kontrolle	-Stress/Kontrolle	-Gruppe und Alter	-Kontrolle
0,285	0,142	0,327	0,006

**Tab.4.10:** Ergebnisse der multivariaten linearen Regression bzgl. der Effekte von Alter und Stress auf die Myelinisierung neuronaler Fortsätze in der Capsula interna.

### 4.2.3 Ausbildung neuronaler Strukturen im Hippocampus (CA3-Region)

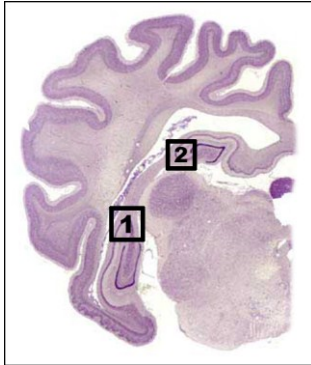


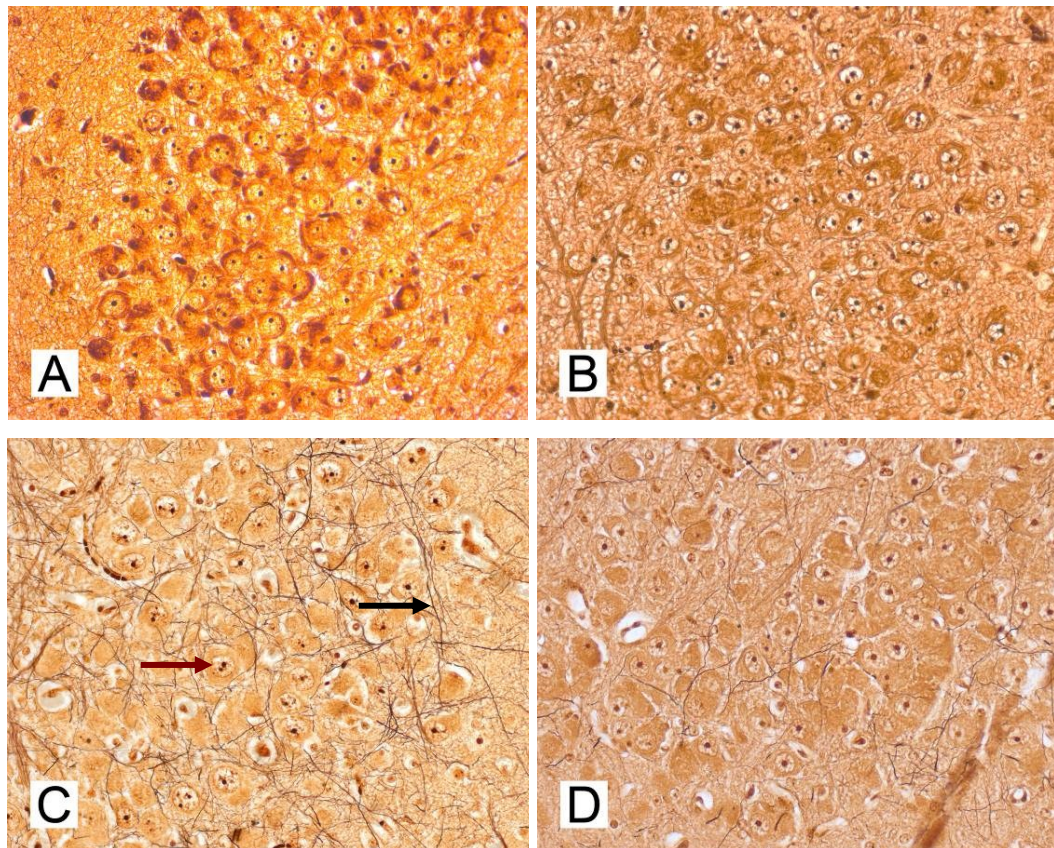
Abb. 4.27: Lokalisation der untersuchten Hirnregionen im Hippocampus.

Um die Effekte von pränatalem Stress im Hippocampus zu untersuchen, wählten wir das Stratum pyramidale auf Höhe der CA3-Region und analysierten dessen ventralen (1) und dorsalen (2) Abschnitt (Abb. 4.27).

Einfluss des Alters: Im Vergleich zum 110. GT verzeichneten die Kontrollen am 130. GT eine Zunahme in der Dichte der neuronalen Struktur im Stratum pyramidale (ventral/dorsal:  $p < 0,05$ ; Abb. 4.28, Abb. 4.29, Abb. 4.30 und Abb. 4.31).

Einfluss von Stress: Am 110. GT gab es keine Unterschiede zwischen Kontroll- und Stressgruppe. Tendenziell war die gemessene Dichte der neuronalen Strukturen bei den Stresstieren niedriger. Am 130. GT wiesen die Stresstiere im Vergleich zur Kontrolle eine niedrigere strukturelle Dichte im Stratum pyramidale der CA3-Region auf (ventral:  $p < 0,05$ , dorsal:  $p < 0,001$ ; Abb. 4.28, Abb. 4.29, Abb. 4.30 und Abb. 4.31).



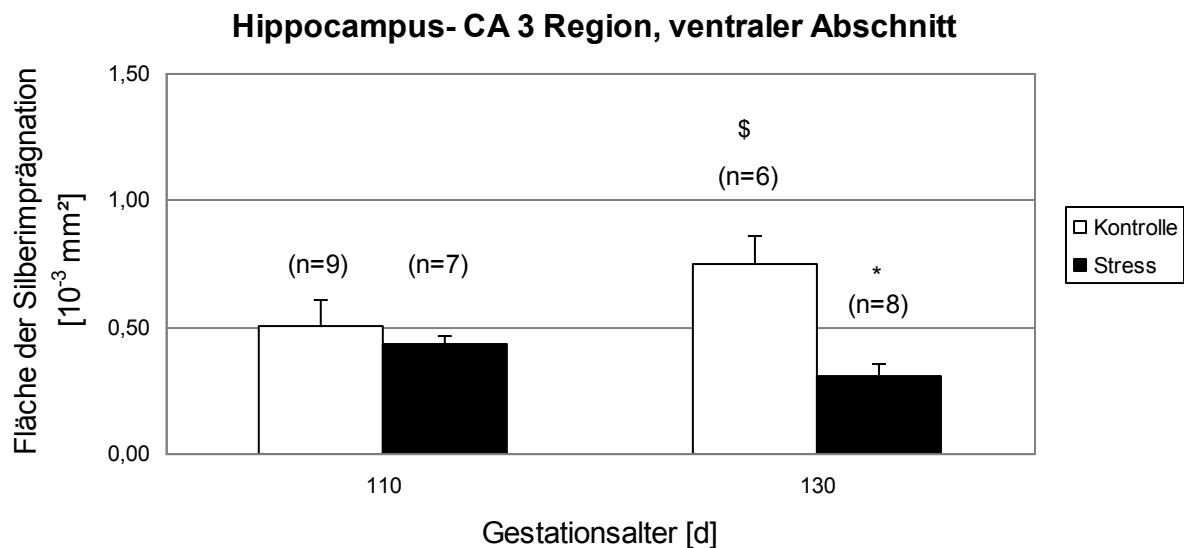


**Abb.4.28:** Mikrofotografien der neuronalen Struktur im Hippocampus CA3-Region, ventraler Abschnitt. Silberimprägnation.

➔ Zelle mit Zellkern   ➔ Neuronaler Fortsatz

A: Kontrolltier am 110. Gestationstag  
C: Kontrolltier am 130. Gestationstag

B: Stresstier am 110. Gestationstag  
D: Stresstier am 130. Gestationstag



**Abb.4.29:** Effekte von Alter und Stress auf das neuronale Netzwerk im Hippocampus CA3-Region, ventraler Abschnitt.

MW±SEM; \* p < 0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe. \$ p < 0,05 im Vergleich zum 110. GT.

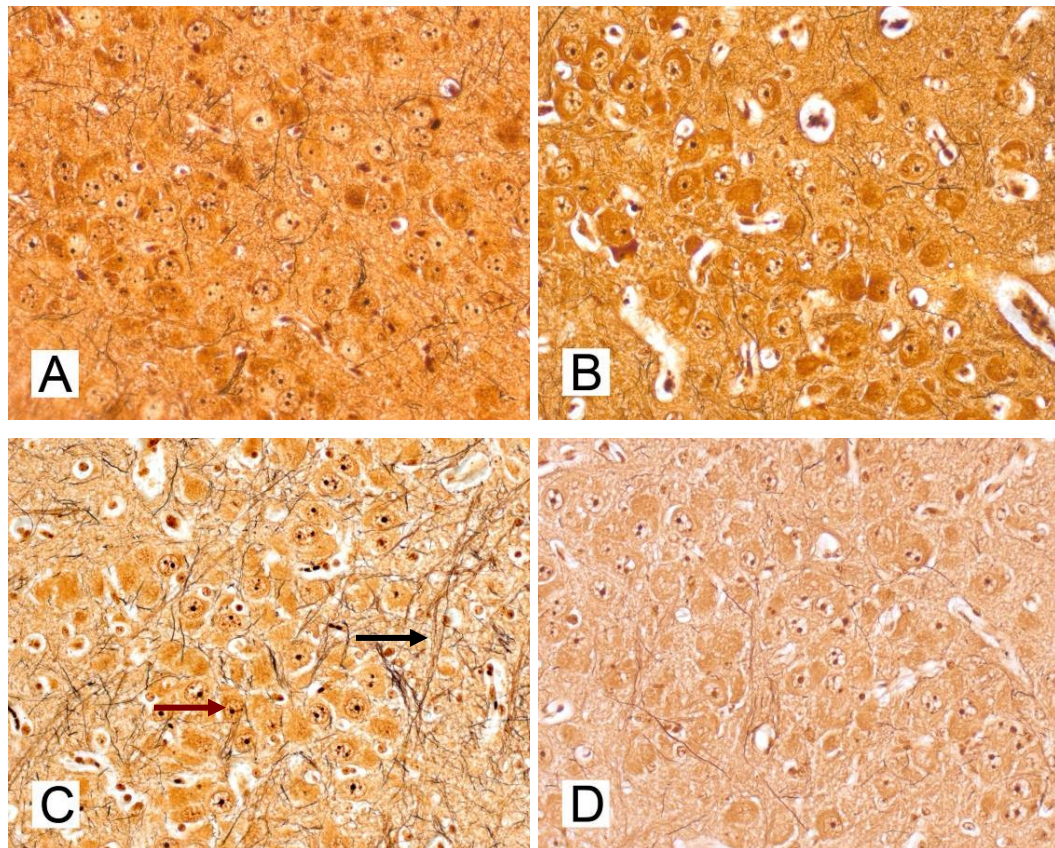
Da die Dichte der neuronalen Strukturen in der CA3-Region gestresster Feten nicht vom 110. zum 130. GT zunimmt, wird die Einflussvariable „Alter“ nicht signifikant. Um jedoch zeigen zu können, dass sich die hippocampalen Strukturen bei den Kontrolltieren mit zunehmendem Alter entwickeln, wurde die multivariate lineare Regression nochmals unter Ausschluss der Stressgruppe durchgeführt, (letzte Spalte Tab. 4.11 und Tab.4.12). Erwartungsgemäß zeigten Feten der Kontrollgruppe eine Zunahme in der Dichte neuronaler Strukturen im Hippocampus vom 110. zum 130. GT (p < 0,05; Abb. 4.29 und Abb. 4.31).

#### Multivariate lineare Regression: Signifikanzprüfung der Einflussvariablen

Gruppe	Gestationsalter	Interaktion zwischen	Gestationsalter
-Stress/Kontrolle	-Stress/Kontrolle	-Gruppe und Alter	-Kontrolle
0,001	0,091	0,000	0,004

**Tab.4.11:** Ergebnisse der multivariaten linearen Regression bzgl. der Effekte von Alter und Stress auf das neuronale Netzwerk im Hippocampus CA3-Region, ventraler Abschnitt.



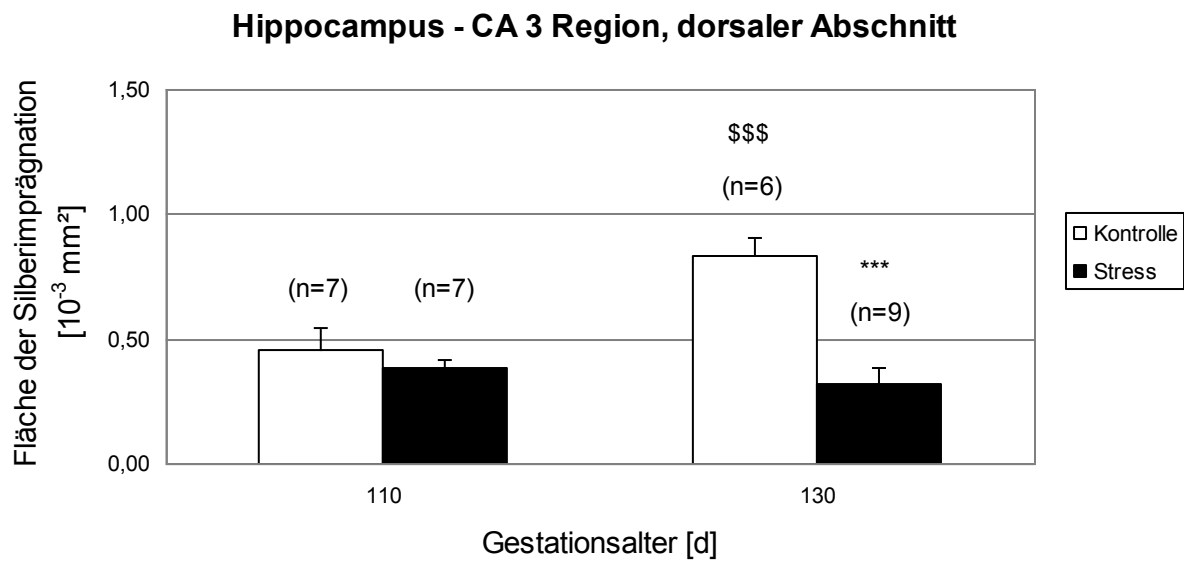


**Abb.4.30:** Mikrofotografien der neuronalen Struktur im Hippocampus CA3-Region, dorsaler Abschnitt. Silberimprägnation.

→ Zelle mit Zellkern    → Neuronaler Fortsatz

A: Kontrolltier am 110. Gestationstag  
C: Kontrolltier am 130. Gestationstag

B: Stresstier am 110. Gestationstag  
D: Stresstier am 130. Gestationstag



**Abb.4.31:** Effekte von Alter und Stress auf das neuronale Netzwerk im Hippocampus CA3-Region, dorsaler Abschnitt.

MW±SEM; \*\*\* p<0,001 im Vergleich zur Kontrollgruppe. \$\$\$ p<0,001 im Vergleich zum 110. GT.

#### Multivariate lineare Regression: Signifikanzprüfung der Einflussvariablen

Gruppe	Gestationsalter	Interaktion zwischen	Gestationsalter
-Stress/Kontrolle	-Stress/Kontrolle	-Gruppe und Alter	-Kontrolle
0,000	0,322	0,000	0,000

**Tab.4.12:** Ergebnisse der multivariaten linearen Regression bzgl. der Effekte von Alter und Stress auf das neuronale Netzwerk im Hippocampus CA3-Region, dorsaler Abschnitt.

## **5 Diskussion**

### **5.1 Methodendiskussion**

#### **5.1.1 Tiermodell**

Das chronisch instrumentierte fetale Schaf hat sich seit den 1970er Jahren hinsichtlich physiologischer und pathophysiologischer Fragestellungen als Modell für die menschliche Fetalperiode etabliert. 1969 beobachtete Liggins am fetalen Schaf, dass eine antenatale Verabreichung von Glukokortikoiden zu einer Akzeleration der Lungenreife führt (Liggins 1969). Noch heute wird diese Therapie zur Senkung der Mortalität, durch eine Verminderung pulmonaler und zerebraler Komplikationen, bei einer drohenden Frühgeburt eingesetzt.

Im Rahmen experimenteller Arbeiten eignet sich das Schaf insbesondere durch seine Größe und Robustheit als Versuchstier. Bezüglich der intrauterinen Hirnentwicklung weisen Schafe im Vergleich zu Nagetieren einen dem Menschen ähnlichen Verlauf auf. Dies betrifft vor allem die Myelinisierung und funktionelle Hirnentwicklung, wenn auch das Schafgehirn zur Geburt reifer ist (Dobbing & Sands 1979, Astrom 1967). Neben dem vergleichbaren maternalen Gewicht entspricht auch das Verhältnis zwischen fetaler und maternaler Masse zum Ende der Gestation in etwa dem des Menschen. Des Weiteren kann man wie beim Menschen, in der Mehrzahl der Fälle, mit einer Einlings- oder Zwillingssträchtigkeit rechnen (Lang et al. 2001).

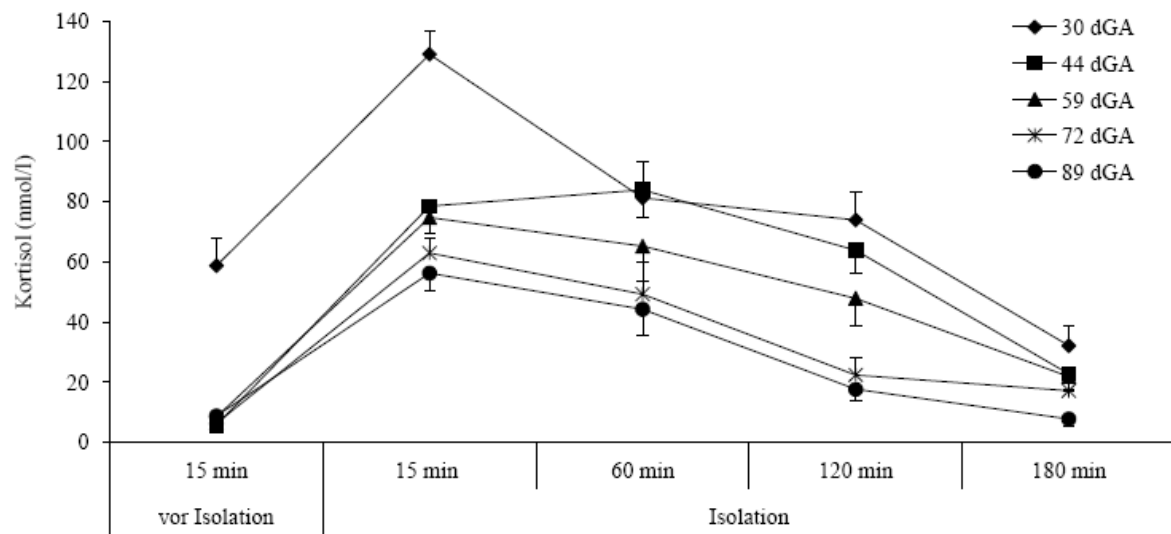
Um die Effekte von pränatalem Stress zu untersuchen, wäre neben dem Schaf auch der nichtmenschliche Primat geeignet. Experimente an diesen Tieren sind jedoch aus ethischer Sicht nicht zweifelsfrei vertretbar und durch einen hohen finanziellen Aufwand oft nicht umsetzbar. Grundsätzlich müssen bei tierexperimentellen Versuchen tierschutzrechtliche Belange hinterfragt werden und der hohe personelle Aufwand für die Haltung der Versuchstiere gerechtfertigt sein. Dies hat ebenfalls zur Folge, dass der Stichprobenumfang der Versuchsgruppen in der hier vorliegenden Arbeit begrenzt, jedoch für die statistischen Aussagen ausreichend war.

### 5.1.2 Stressmodell

Um die Effekte von pränatalem Stress zu untersuchen, benötigten wir einen artgerechten Stressor, der eine chronische Stresssituation simuliert und im Verlauf der Experimente eine möglichst geringe Adaptation auslöst.

Da Schafe ausgeprägte Herdentiere sind und ihre Fütterung und Haltung in der Gruppe erfolgen sollte (Empfehlung der Gesellschaft für Versuchstierkunde) führt eine Einzelisolation, wie sie in der vorliegenden Arbeit zweimal pro Woche für jeweils 3 h vom 30.-100. GT durchgeführt wurde, bei diesen Tieren zu enormen psychosozialen Stress (Price et al. 1980). Der von uns gewählte Zeitraum für die Isolation entsprach dabei in etwa der 6.-28. Schwangerschaftswoche (SSW) beim Menschen. Die Tiere bereits in der frühen Embryonalphase, also vor dem 30. GT zu stressen, hätte zu einer erhöhten Abortrate geführt und stellte somit keine Alternative dar (Behrens et al. 2001).

Der durch die Isolation induzierte Stress der schwangeren Muttertiere konnte anhand der Kortisolstressantwort am 30., 44., 59., 72. und 89. GT verifiziert werden (Rakers et al. 2012). Hierzu wurde den Tieren 15 min vor, sowie 15, 60 und 180 min nach Beginn der Isolation Blut entnommen. Während des gesamten Versuchsablaufs konnte ein Anstieg der Plasmakortisolkonzentration, im Vergleich zum Basiswert (15 min vor der Isolation) festgestellt werden (Abb.5.1). Am 30. GT war der Kortisolspiegel deutlich höher als an den darauffolgenden Tagen, was auf die unbekannte Prozedur der Blutentnahme zurückgeführt wurde. Der Abfall der Fläche unter der Kurve (integrierter Kortisolspiegel und Maß für die gesamte Kortisolausschüttung während der Isolation) auf 49% am 89. GT zeigte im Vergleich zum 44. GT (an dem die Blutabnahme keinen zusätzlichen Stress mehr verursachte), dass sich die Tiere nach wiederholter Isolation teilweise an die Isolation adaptierten (Rakers et al. 2012). Trotzdem waren die mütterlichen Spitzenkortisolwerte am 89. GT noch um mehr als das sechsfache des Basiswertes erhöht, sodass von einem suffizienten Stressmodell ausgegangen werden kann.



**Abb.5.1:** Plasmakortisolkonzentration trächtiger Tiere vor und während der Isolation vom 30.-89. GT. MW±SEM; n=20; dGA= Gestationstag (Rakers 2012).

Die Bedeutung der Isolation als suffizienter Stressor wird dadurch unterstrichen, dass die Stressreaktion von Schafen während einer Isolation deutlich abnimmt und sie ein ruhigeres Verhalten aufweisen, wenn man ihnen Bilder von Artgenossen präsentiert (Da Costa et al. 2004). Auch die Konzentration der Stresshormone sowie die Aktivität stresssensitiver Systeme im Gehirn (Nucleus paraventricularis im Hypothalamus, Amygdala) dieser Tiere waren vergleichsweise niedriger (Da Costa et al. 2004). Im Umkehrschluss könnte die visuelle oder auditorische Wahrnehmung artfremder Lebewesen, wie Hunden oder Menschen, möglicherweise zu einer Verstärkung der Stressantwort während der Isolation führen.

Eine Studie aus Frankreich zeigte, dass trächtige Schafe während der Isolation mit einem weniger ängstlichen Verhalten reagierten als nicht trächtige Tiere (Viérin & Bouissou 2001). Möglicherweise kommt es im Rahmen einer Schwangerschaft zu einer verminderten Stressempfindlichkeit oder zu einer besseren Anpassungsfähigkeit. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die Entstehung eines regelmäßigen Stressrhythmus durch eine zufällige örtliche und zeitliche Rotation der Tierversuche zu vermeiden und einer Gewöhnung an den Stressor entgegen zu wirken, mit dem Ergebnis, dass die Tiere ausreichend gestresst waren (siehe oben).

Damit bietet unser Stressmodell eine vertretbare Adaptation an den Stressor und führt zu nachweisbaren zerebralen Effekten, welche seine Validität bestätigen.

Für die Experimente dieser Arbeit kamen ausschließlich Versuchstiere zur Auswertung, welche nach Abschluss des Stressprotokolls, ab dem 105. GT chronisch instrumentiert wurden. Dieses Verfahren stellte einen zusätzlichen Stress für die Tiere dar. Da die Kontroll- und Stressgruppen jedoch gleichermaßen behandelt wurden, ist hier von einem systematischen und nicht von einem Gruppeneffekt auszugehen.

### **5.1.3 Histologie**

Um qualitativ hochwertige histologische Färbungen zu erhalten, ist eine optimale Vorbehandlung der Gehirne erforderlich. Unser Ziel war es Präparate herzustellen, die ein möglichst unverfälschtes Zellbild abbilden. Hierfür eignet sich die Perfusionsfixierung von Organen, da bei diesem Verfahren das Gewebe am vitalen, narkotisierten Tier fixiert wird und somit postmortale Vorgänge wie autolytische Zellveränderungen vermieden werden (Mulisch & Welsch 2010). Vor Beginn der Fixierung wurden die Hirngefäße mit isotonischer Kochsalzlösung blutleer gespült. Es wurde darauf geachtet, dass das Fixiermittel Paraformaldehyd das Gewebe zügig und vollständig durchtränkte. Die anschließende Einbettung in Paraffin hat sich bewährt, um Präparate im Mikrometerbereich anzufertigen.

Alle Schnitte wurden auf Superfrost Plus Objektträger aufgezogen. Durch deren positive Ladung werden die Präparate über elektrostatische Anziehungskräfte gebunden. Wesentliche Vorteile gegenüber herkömmlichen Objektträgern sind, dass keine Haftmittel verwendet werden müssen, unerwünschte Hintergrundfärbungen entfallen und die Schnitte beim Färben nicht abschwimmen (<http://www.menzel.de>, 15.02.2012).

Um zunächst ein Übersichtpräparat zu erhalten, führten wir die Hämtoxylin-Eosin Färbung durch. Diese Färbung wird routinemäßig angewandt und hat sich als zuverlässige Methode in der Histologie etabliert. Erwartungsgemäß färbte der Farbstoff Hämalan basophile Strukturen blau-violett und der Farbstoff Eosin azidophiles Zytoplasma rot an.

Für die Darstellung der Nervenfasern war die Silberfärbung nach Bielschowsky ein geeignetes Verfahren. Wie erwünscht stellten sich Axone, Dendriten und

Neurofibrillen schwarz dar, während sich das umliegende Gewebe gelb bis braun anfärbte.

Um die Myelinisierung im fetalen Gehirn zu visualisieren, wendeten wir die immunhistochemische Nachweismethode von MBP (basisches Myelinprotein) an. MBP ist eines der Hauptproteine im zentralen Myelin und trägt zu dessen Stabilisierung und Kompaktierung bei. Neben CNP (2'-3'-Cyclic nucleotid 3'-phosphohydrolase) ist es ein Marker differenzierter Oligodendrozyten. Im Gegensatz zu CNP, welches zum Nachweis früher Stadien der Myelinisierung verwendet wird, ist MBP auch noch im kompakten Myelin nachweisbar (Reiser et al. 1994, Pfeiffer 1993, Trapp et al. 1988). Des Weiteren ist MBP nach bisherigen Kenntnissen das einzige Protein, welches essentiell für die Synthese von Myelin ist (Boggs 2006, Moscarello 1997). Untersuchungen am menschlichen Feten (15.-24 SSW) haben gezeigt das der Nachweis von MBP sensitiver ist und zu einem früheren Zeitpunkt gelingt als der Nachweis von Myelin durch CNP, MAG (Myelin-assoziiertes Glykoprotein) oder eine Luxol Echt Blau Färbung (Bodhireddy et al. 1994). Durch seine gleichmäßige Verteilung in den myelinisierten Zellfortsätzen kann MBP als zuverlässiges Markermolekül zum Nachweis beginnender und voranschreitender Myelinisierung genutzt werden (Jakovcevski & Zecevic 2005, Baumann & Pham-Dinh 2001, Hasegawa et al. 1992).

Um die Vergleichbarkeit der Präparate zu gewährleisten und den Einfluss der Färbungen zu minimieren, wurden die zu färbenden Schnitte innerhalb der Gruppen weitgehend gemischt und in gemeinsamen Durchläufen gefärbt.

#### **5.1.4 Quantitative Bildanalyse**

Nach Abschluss der Färbungen wurden alle Präparate am Mikroskop begutachtet und mittels Farbvideokamera eingescannt. Qualitativ minderwertige Schnitte wurden noch einmal gefärbt. Wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, wurde darauf geachtet jedes Bild unter standardisierten Bedingungen aufzunehmen.

Um die Auswahl der Bildausschnitte replizierbar zu machen, orientierten wir uns an anatomischen Strukturen und verwendeten ein Okular mit Gitternetz. Alle zur Auswertung gebrachten Hirnregionen wurden in 40facher Vergrößerung abgebildet. Diese Methode erlaubt eine gute Vergleichbarkeit verschiedener Bilder und birgt bei konzentrierter Arbeitsweise wenige Fehlerquellen.



## **5.2 Ergebnisdiskussion**

### **5.2.1 Pränataler Stress und fetales Wachstum**

Die Datenerhebung zum fetalen Körper -und Hirngewicht der gestressten Feten zielte darauf ab zu erfahren, ob pränataler Stress zu einer Beeinträchtigung des fetalen Wachstums führt und dies mit einer Störung der Hirnentwicklung assoziiert ist. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Feten gestresster Muttertiere ein signifikant niedrigeres Körpergewicht aufweisen. Ein vermindertes Hirngewicht konnte mit dem hier verwendeten Stressmodell nicht reproduziert werden.

Studien, die in Analogie zu pränatalem Stress, die Folgen einer antenatalen Glukokortikoidtherapie am fetalen Schaf untersuchten, konnten sowohl ein reduziertes Körpergewicht als auch ein vermindertes Hirngewicht nachweisen (Moss et al. 2005, Huang et al. 1999). Ebenso zeigten Untersuchungen am humanen Fetus, dass eine wiederholte Behandlung mit Glukokortikoiden während der Schwangerschaft, eine Wachstumsverzögerung und einen verminderten Kopfumfang (Ausdruck eines reduzierten Hirnvolumens) zur Folge hat (Murphy et al. 2008, Abbasi et al. 2000, French et al. 1999).

Aus dem Bereich der neuropsychiatrischen Forschung ist bekannt, dass mütterliche Depressionen und negativer Stress (distress) während der Schwangerschaft zu einer erhöhten Inzidenz wachstumsretardierter Feten, einem verminderten Geburtsgewicht und häufigeren Frühgeburten führen (Grote et al. 2010, Diego et al. 2009, Rondó et al. 2003). Bereits vor 20 Jahren legte eine Studie, welche 1545 schwangere Patientinnen einschloss, nahe, dass das Risiko für eine intrauterine Wachstumsretardierung signifikant steigt, wenn die werdende Mutter vermehrt psychosozialen Stress, Depressionen und Ängsten am Ende des 2. Trimenon ausgesetzt ist (Cliver et al. 1992). Unterstrichen werden diese Ergebnisse nochmals durch eine retrospektive Untersuchung von Maric et al. (2009), welche zeigen konnte, dass die neugeborenen Säuglinge von Müttern, welche in dem Zeitraum der dreimonatigen Bombardierungen Serbiens 1999 (im Rahmen des Kosovo-Konfliktes) schwanger waren und somit einem massivem Stress ausgesetzt waren, ein signifikant niedrigeres Geburtsgewicht ( $p < 0,001$ ) aufwiesen.

Wie auch unsere Ergebnisse vermuten lassen, ist ein direkter Zusammenhang zwischen pränatalem Stress und dem fetalen Wachstum wahrscheinlich.

Eine mögliche Erklärung, weshalb pränataler Stress zu einer Wachstumsverzögerung führt, ist, dass die Proliferation der Zellen zu Gunsten der Zelldifferenzierung durch Kortisol gehemmt wird (Kapitel 2.3). Für das heranwachsende Individuum ist die damit einhergehende vorzeitige Reifung bestimmter Organe, in erster Linie als Adaptation des Organismus an widrige Umweltbedingungen zu sehen. Kurzfristige Effekte wie die Verkürzung der Schwangerschaftsdauer und eine Anpassung bestimmter Organsysteme an Stress oder Nahrungsmangel, stellen aus Sicht der Evolution das Überleben sicher. Langfristige Mechanismen, welche zu Erkrankungen im späteren Leben führen, werden hierfür in Kauf genommen (Schwab 2007). Eine Zielstellung zukünftiger Arbeiten sollte es daher sein, die histologischen Effekte von pränatalem Stress auf die Zellproliferation genauer zu untersuchen, da sie einen weitreichenden Einfluss auf die Entwicklung verschiedener Organsysteme zu haben scheint.

Neben hohen Stresshormonkonzentrationen führt auch ein erhöhter Katecholaminspiegel, wie er im Rahmen einer stressbedingten sympathoadrenergen Aktivierung auftritt, zu einer Beeinflussung des fetalen Wachstums. Dies geschieht zum einen über die Hemmung des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors (IGF) (Kapitel 2.4.3) und zum anderen über eine Verminderung der uteroplazentaren Durchblutung (McMillen & Robinson 2005, Bzozkie et al 1995). Am Schafmodell konnte gezeigt werden, dass die maternale Infusion von Noradrenalin zu einer sofortigen Konstriktion der plazentaren Gefäße führt und konsekutiv mit einer verminderten fetalen Oxygenierung einhergeht (Stevens & Lumbers 1995). Auch Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe am fetalen Schaf zeigten, dass mütterlicher Stress (vom 30.-100. GT) die uterine Durchblutung vermindert (Rakers et al. 2013) und somit einen potentiellen Risikofaktor für ein niedrigeres Geburtsgewicht darstellt.

Definitionsgemäß entspricht ein vermindertes Geburtsgewicht bei noch normal entwickelter Körperlänge (normwertiges Extremitätenwachstum) und einem normalem Kopfumfang einer asymmetrischen Wachstumsretardierung (Lang et al. 2001). Vermindert ist vor allem der abdominelle Umfang (Strauss et al. 2008). Davon ausgehend, dass der Kopfumfang ein Ausdruck für das Hirnvolumen/-gewicht der Tiere ist, sprechen unsere Ergebnisse am ehesten für eine stressbedingte asymmetrische Wachstumsretardierung. Eine der häufigsten Ursache für die Beeinträchtigung des fetalen Wachstums ist die Unterversorgung des Feten mit

Nährstoffen und Sauerstoff, bedingt durch eine inadäquate uteroplazentare Durchblutung (Lang et al. 2001), wie sie auch durch Stress induziert werden kann (siehe oben). Umfassende Daten zu den Effekten von mütterlichem Stress auf das fetale Wachstum liegen jedoch kaum vor. Die Hauptschwerpunkte experimenteller Ansätze zur Erzeugung einer fetalen Wachstumsrestriktion (am Schafmodell) liegen bisher auf der Auslösung adrenerger Reaktionen des Muttertieres (Hypoxie, Hitzeexposition und Substratzug), der chirurgischen Entfernung von Teilen der Plazenta und der mechanischen, partiellen Okklusion der uterinen Strombahn (Lang et al. 2001, Clapp 1992). Letzteres führt abermals, über eine Einschränkung der uterinen Perfusion, zu reproduzierbaren Beeinträchtigungen des fetalen Wachstums unter relativer Aussparung des Hirnwachstums (Lang et al. 2001).

Auch unsere Experimente führten nicht zu einer Reduktion des fetalen Hirngewichtes. Allerdings bedeutet ein unbeeinträchtigtes Hirnwachstum nicht automatisch eine unbeeinträchtigte Hirnentwicklung. Die Hirnentwicklung kann durchaus gestört sein. So führen pränataler Stress oder eine pränatale Betamethasonbehandlung zu einer vorzeitigen Reifung des REM-Schlafes und einer persistierenden Schlafstadienfragmentierung (Groh et al. 2007).

Des Weiteren ist ein vermindertes fetales Wachstum mit häufig auftretenden Zivilisationskrankheiten aus dem kardiovaskulären und metabolischen Bereich assoziiert worden (Morisson 2008, Sloboda et al. 2005). Auch wenn ein vermindertes fetales Wachstum nicht die Ursache für diese Erkrankungen ist, so führt die zugrunde liegende Exposition des Feten doch zu anhaltenden Funktionsstörungen im Verdauungssystem und einem erhöhten Vasotonus, der entweder direkt „programmiert“ wird oder Ausdruck der lebenslangen Exposition erhöhter Glukokortikoidspiegel oder einer autonomen Dysfunktion ist (Krishnaveni et al. 2013, Rinaudo & Wang 2011, Harris & Seckl 2011, Nuyt & Alexander 2009, McMillen et al. 2009, Schwab 2007, Frasch et al. 2007, McMillen & Robinson 2005).

### 5.2.2 Effekte nach pränatalem Stress auf den Hippocampus

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Stressmodell (Einzelisolation trächtiger Schafe vom 30.-100. GT zweimal pro Woche für jeweils 3 h) führte beim fetalen Schaf zu einer verminderten strukturellen Dichte im neuronalen Netzwerk der CA3-Region im ventralen und dorsalen Abschnitt des Hippocampus am 130. Gestationstag ( $p < 0,05$ ). Am 110. GT konnten kein Unterschied zwischen der Stress – und Kontrollgruppe beobachtet werden. Dies spricht am ehesten dafür, dass pränataler Stress, im 1. und 2. Trimenon, die hippocampale Reifung prolongiert beeinflusst.

Der Hippocampus spielt nicht nur eine wesentliche Rolle für die Bildung von Gedächtnisinhalten und Verarbeitung von Emotionen, er ist ebenso maßgeblich an der Ausbildung kognitiver Fähigkeiten und der Regulation der Stressantwort beteiligt (Koelsch et al. 2007, Wolley et al. 1990). Dies lässt bereits vermuten, dass pränataler Stress über eine Änderung der hippocampalen Architektur die Regulation der HHN-Achse empfindlich beeinflusst (Lupien et al. 2009). In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen konnte eine Vielzahl von Studien zeigen, dass pränataler Stress (täglicher Stress während der 24. SSW) zu einer Inhibition der Neurogenese und Veränderungen der Dendritenarchitektur im Hippocampus führt (Rhesusaffe, Ratte). Assoziiert waren diese Beobachtungen unter anderem mit Lerndefiziten und Verhaltensauffälligkeiten im späteren Leben. (Hosseini-sharifabad & Hadinedoushan 2007, Coe et al. 2003, Lemaire et al. 2000). Ähnliche morphologische Veränderungen wurden durch die antenatale Applikation synthetischer Glukokortikoide erzielt. Rhesusaffen, denen man pränatal Dexamethason injizierte, wiesen eine dosisabhängige Schädigung pyramidaler Neurone und eine Dendritendegeneration in der CA3-Region des Hippocampus auf (Uno et al. 1990).

Im Vergleich zu anderen Hirnregionen, wie den von uns untersuchten Strukturen des tiefen Marklagers (Corpus callosum, Corona radiata, Capsula interna) scheint der Hippocampus eine vielfach höhere Vulnerabilität gegenüber Stress zu besitzen. Hierfür verantwortlich ist unter anderem die hohe Dichte an GR in dieser Struktur (Uno et al. 1990, McEwen et al. 1986). Neben rezeptorvermittelten Effekten wie akuten strukturellen Veränderungen (siehe oben), führt Stress über einen längeren Zeitraum auch zu einer Modifikation der Genexpression (Weaver et al. 2004, Kitraki

et al. 1999). Dies hat zur Folge, dass chronischer Stress in der Schwangerschaft, wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben, zu einer verminderten Expression von GR im Hippocampus und konsekutiv zu einer Abnahme des negativen Feedbacks führt. In Übereinstimmung damit konnte gezeigt werden, dass pränatal gestresste Ratten im adulten Alter Stresssituationen mit einer signifikant höheren Kortisolausschüttung beantworten und in bedrohlichen Situationen stärkere emotionale Reaktionen sowie Verhaltensauffälligkeiten aufweisen (Takahashi 1998, Friede et al. 1986).

Ungeachtet dessen bleibt noch zu erwähnen, dass zumindest ein Teil dieser programmierenden Effekte reversibel ist. Diesbezüglich zeigten Untersuchungen an Ratten, dass ein fürsorglicher mütterlicher Umgang („maternal care“) zu einem Anstieg der GR-mRNA Expression im Hippocampus der Jungtiere führt und gleichsam die Aktivität der HHN-Achse gedrosselt wird (Liu et al. 1997, Meaney et al. 1989).

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse im Hippocampus gehen konform mit den wissenschaftlichen Erkenntnissen bisheriger Studien und bestätigt die Validität unseres Stressmodells.

### **5.2.3 Zerebrale Effekte nach pränatalem Stress auf das neuronale Netzwerk**

Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Stressmodell konnte kein Effekt auf die Ausbildung neuronaler Fortsätze nachgewiesen werden. Dies traf auf alle untersuchten Hirnregionen (Subkortikale weiße Substanz, Corpus callosum, Corona radiata und Capsula interna) gleichermaßen zu.

Vergleichbare experimentelle Arbeiten, die sich mit den Effekten von pränatalem Stress auf die Dichte neuronaler Fortsätze beschäftigt haben, untersuchten insbesondere die neuronale Entwicklung in der Lamina II und III des Kortex. Hier konnten Murmu et al. (2006) nachweisen, dass Stress zum Ende der Schwangerschaft (Stress vom 15.-20. GT) zu einer verminderten Dichte und Länge der Dendriten pyramidalen Neurone im präfrontalen und orbitofrontalen Kortex der männlichen Ratte führt. Diese Region lässt sich am ehesten mit der von uns untersuchten subkortikalen weißen Substanz vergleichen. Bei der Gegenüberstellung

beider Untersuchungen ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Gehirnentwicklung der Ratte, zum Zeitpunkt der Geburt, dem eines menschlichen Feten im 7. Entwicklungsmonat entspricht und auch der Entwicklung des Schaffeten voraus ist (Morgane et al. 2002, Romijn et al. 1991). Überdies führten wir in unserer Untersuchung die Stressung der trächtigen Schafe schon im 1. und 2. Trimenon durch und nicht erst zum Ende der Schwangerschaft. Des Weiteren teilten Murmu et al. (2006) die neuronalen Fortsätze in basale und apikale Dendriten ein und zeigten, dass ihre Ergebnisse stark von dieser Betrachtung abhingen. Diesbezüglich führte Stress im letzten Trimenon zu einer Beeinträchtigung der Dichte apikaler Dendriten im präfrontalen und orbitofrontalen Kortex, während die Dichte basaler Dendriten nur im orbitofrontalen Kortex reduziert war. Möglicherweise hätte eine Differenzierung der Dendritentypen oder die Stressung zu einem späteren Zeitpunkt auch bei uns zu abweichenden Ergebnissen geführt. Trotz allem, die aktuelle Studienlage ist uneinheitlich und lässt keinen endgültigen Schluss zu. Dies zeigt eine weitere experimentelle Arbeit, welche keinen Effekt auf die absolute Dichte dendritischer Verzweigungen in der Lamina II und III des präfrontalen Kortex nach pränatalem Stress (dreimal täglich für 45 min vom 14.-21. GT, Ratte) hatte (Michelsen et al. 2007).

Ferner weist eine aktuelle Untersuchung darauf hin, dass pränataler Stress (zweimal täglich für 30 min vom 12.-16. GT, Ratte), abhängig vom Geschlecht und der Hirnregion, zu einer Neuronendegeneration sowohl im Neokortex als auch im Hippocampus führt (Mychasiuk et al. 2012). Zwar haben wir in der vorliegenden Arbeit nicht zwischen den Geschlechtern unterschieden, wir konnten jedoch, in Übereinstimmung mit Mychasiuk et al. (2012), eine Beeinträchtigung des neuronalen Netzwerkes im Hippocampus nachweisen. Ob es dabei geschlechtsspezifische Unterschiede gibt, sollte Gegenstand nachfolgender Untersuchungen sein.

Neben den oben genannten Studien liefern auch die Untersuchungen zur antenatalen Anwendung von synthetischen Glukokortikoiden Hinweise zu den Effekten von pränatalem Stress. In experimentellen Versuchen (am Schaf) konnte eine Verzögerung der Myelinisierung und eine Hemmung der Neurogenese nach der wiederholten Gabe von synthetischen Glukokortikoiden (in klinischer Dosierung) nachgewiesen werden. (Antonow-Schlorke et al. 2009, Seckl 2008, Quinlivan et al. 1999). Eine mögliche Erklärung, weshalb wir keinen Effekt auf die Ausbildung des

neuronalen Netzwerkes in der weißen Substanz sehen konnten, ist, dass Kortisol im Gegensatz zu synthetischen Glukokortikoiden, die die Plazenta ungehindert passieren (Anderson et al. 1977), durch die 11 $\beta$ -HSD2 zu einem Großteil deaktiviert wird. Somit muss zunächst ein relativ hoher mütterlicher Kortisolspiegel vorliegen, bevor die Stresshormone den fetalen Kreislauf erreichen (Huizink 2004, Gitau et al. 2001).

Des Weiteren scheinen die neurotoxischen Effekte von synthetischen Glukokortikoiden vom aktivierten Rezeptortyp abzuhängen. Hierbei werden MR, welche eine niedrigere Sättigungsgrenze aufweisen und eine höhere Affinität zu Kortison haben, bei niedrigen Kortisonspiegeln besetzt und für neuroprotektive Effekte verantwortlich gemacht. Höhere Kortisonspiegel und synthetische Glukokortikoide, welche eine hohe GR-Spezifität aufweisen, führen unterdessen zu einer verstärkten Aktivierung von GR und somit zu neurotoxischen Effekten (Hassan et al. 1996, Scully & Otten 1995, Packan & Sapolsky 1990, McEwen et al. 1987, Reul & de Kloet 1985). Am fetalen Schaf konnte gezeigt werden, dass die GR im Kortex erst am 60. GT exprimiert werden (Brodhun et al. 2003). Unsere Versuche hingegen haben bereits am 30. GT begonnen. Dies bedeutet, dass während einer langen Phase unserer Stressung, noch keine oder nur unreife GR im ZNS der Feten vorhanden gewesen waren, um eine Stressantwort zu vermitteln. Ungeachtet dessen gibt es keine Untersuchungen dazu, ob das Vorhandensein von GR ein Garant für deren Aktivität ist.

Wie bereits oben erwähnt, könnte auch die Intensität unseres Stressors zu gering gewesen sein um zerebrale Veränderungen sichtbar zu machen. Da die Muttertiere jedoch mit deutlich erhöhten Kortisolwerten reagierten, ist dies eher unwahrscheinlich. Allerdings nahm die Kortisolantwort der trächtigen Tiere, durch eine Teiladaptation an den verwendeten Stressor, zum Ende der Versuche ab, also zu jener Zeit, in der die GR reifen. Nichts desto trotz reichen bereits gering erhöhte Glukokortikoidspiegel, wie sie im Rahmen einer Stressreaktion auftreten, um neben MR auch GR zu besetzen und somit neurotoxische Effekte zu induzieren (Kapitel 2.4.2).

Schlussendlich konnten wir unsere erste Hypothese, welche besagt, dass pränataler Stress einen Einfluss auf die Ausbildung des neuronalen Netzwerkes hat, mit den in dieser Arbeit gewählten Bedingungen nicht nachweisen. Das bedeutet, dass eine



Beeinträchtigung des neuronalen Netzwerkes, in den hier untersuchten Hirnregionen, vermutlich keine wesentliche Ursache für die Entstehung von Veraltensauffälligkeiten im späteren Leben ist.

#### **5.2.4 Zerebrale Effekte nach pränatalem Stress auf die Myelinisierung**

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass eine Isolation trächtiger Tiere (vom 30.-100. GT) keinen Einfluss auf die Myelinisierung in den von uns untersuchten Hirnregionen (Subkortikale weiße Substanz, Corpus callosum, Corona radiata, Capsula interna) im fetalen Gehirn hat.

Da es derzeit keine vergleichbaren experimentellen Arbeiten gibt, liefern uns vor allem die Studien zu den Effekten von synthetischen Glukokortikoiden wichtige Hinweise darauf, welchen Einfluss pränataler Stress auf die Myelinisierung haben könnte. Einzelne Untersuchungen zeigten, dass die mehrmalige Applikation von Glukokortikoiden (0,5 mg/kg, am 104., 111., 118 und 124. GT) zu einer Beeinträchtigung der Myelinisierung führte. Diesbezüglich konnte am fetalen Schaf eine verzögerte Myelinisierung der Axone des Sehnervens und des Corpus callosum nachgewiesen werden (Huang 2001, Dunlop et al. 1997). Auch unsere Arbeitsgruppe konnte nach einer Betamethason-Applikation (am 93. und 94. GT, in klinisch vergleichbarer Dosierung) am 95. GT akute Störungen der Myelinisierung in der weißen Substanz, der Capsula interna und dem Corpus callosum nachweisen (Antonow-Schlorke et al. 2009). Mögliche Ursachen, weshalb wir unter den experimentellen Bedingungen dieser Arbeit keinen Effekt auf die Myelinisierung zeigen konnten, sind bereits in Kapitel 5.2.3 ausführlich erläutert.

Noch zu bemerken ist, dass die Effekte von synthetischen Glukokortikoiden (Dexamethason) vom Entwicklungsstadium des Gehirns abhängig zu sein scheinen. Im Bezug darauf gibt es Hinweise, dass die Applikation von Glukokortikoiden zu Beginn der Myelinisierung einen stimulierenden Effekt hat, während sich der spätere Einsatz eher inhibierend auf die Differenzierung der Oligodendrozyten und die Myelinisierung auswirkt (Almazan et al. 1986). Unter der Annahme, dass sich nach pränatalem Stress ähnlich Effekte zeigen, könnte der Zeitpunkt unserer Stressung noch vor der vulnerablen Phase liegen, in der eine Beeinträchtigung der Myelinisierung möglich gewesen wäre.

Wie auch beim neuronalen Netzwerk, hatte pränataler Stress, mit den in dieser Arbeit gewählten experimentellen Bedingungen, keinen Einfluss auf die Myelinisierung. Somit scheint auch eine Störung der Myelinisierung, in den von uns untersuchten Hirnregionen, nicht verantwortlich zu sein für Verhaltensauffälligkeiten im späteren Leben.

## 6 Schlussfolgerungen

Da die Pränatalperiode wesentliche Effekte auf das neuropsychiatrische Outcome im späteren Leben hat, besteht ein großes wissenschaftliches und gesellschafts-politisches Interesse daran zu verstehen, welche funktionellen und strukturellen Veränderungen sich während der Hirnentwicklung ereignen. Wir untersuchten in der vorliegenden Arbeit den Einfluss von chronischem Stress zwischen dem 30. und 100. GT auf die Myelinisierung und Formierung des neuronalen Netzwerkes im fetalen Gehirn. Des Weiteren wurde der Zusammenhang zwischen pränatalem Stress und dem fetalen Wachstum untersucht.

In Übereinstimmung mit der aktuellen Literatur konnte gezeigt werden, dass pränataler Stress bereits intrauterin zu einer verminderten strukturellen Dichte des neuronalen Netzwerkes im dorsalen und ventralen Abschnitt des Hippocampus führt. Dieser Effekt ist möglicherweise verantwortlich für die Entstehung von Lerndefiziten und Verhaltensauffälligkeiten im späteren Leben. Inwieweit die von uns beschriebenen Effekte reversibel sind und die Bedeutung für die Pathogenese neuropsychiatrischer Erkrankungen haben, sollte Inhalt zukünftiger Untersuchungen sein. Ebenso sollten künftige Studien den Gestationszeitpunkt der Stressung variieren, um die vulnerablen Phasen der Hirnentwicklung zu ermitteln.

Neben den strukturellen Veränderungen im Hippocampus wiesen die Feten der Stressgruppe, zum Zeitpunkt der operativen Entwicklung, ein niedrigeres Körpergewicht auf. Es ist bekannt, dass eine Wachstumsrestriktion mit häufig auftretenden Erkrankungen aus dem kardiovaskulären und metabolischen Bereich assoziiert ist.

In der subkortikalen weißen Substanz, dem Corpus callosum, der tiefen weißen Substanz und der Capsula interna konnte kein Effekt auf die Entwicklung des neuronalen Netzwerkes dargestellt werden. Scheinbar beeinträchtigt pränataler Stress im 1. und 2. Trimenon die neuronale Entwicklung nicht. Dennoch sollten weitere Untersuchungen klären, ob Effekte in anderen Hirnregionen auftreten und abhängig vom gewählten Gestationszeitpunkt sowie der Stressintensität sind.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit fanden am fetalen Schafgehirn statt. Im Gegensatz zu Nagern, bei denen die Hirnentwicklung und Reifung der HHN-Achse zum größten Teil postnatal stattfindet und deren Gehirne nicht gyriert sind, hat sich

das fetalen Schaf als Modell für die menschliche Fetalperiode etabliert und eignet sich somit gut für die hier durchgeführten Experimente.

Die Ergebnisse dieser Arbeit machen abermals deutlich, dass präventionsorientierte Konzepte und eine Aufklärung schwangerer Frauen, bezüglich der Risiken von pränatalem Stress für das ungeborene Kind, Einzug in den klinischen Alltag erhalten sollten. Außerdem sollten weitere Untersuchungen klären, ob eine postnatale Zuwendung pränatale Effekte durch Stress rückgängig machen kann.

## 7 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abbasi S, Hirsch D, Davis J, Tolosa J, Stouffer N, Debbs R.** (2000). Effect of single versus multiple courses of antenatal corticosteroids on maternal and neonatal outcome. *J Obstet Gynecol*, 182:1243-1249.
- Aghajafari F, Murphy K, Matthews S, Ohlsson A, Amankwah K, Hannah M.** (2002). Repeated doses of antenatal corticosteroids in animals: a systematic review. *J Obstet Gynecol*, 186(4):843-9.
- Ahima R, Krozowski Z, Harlan R.** (1991). Type I corticosteroid receptor-like immunoreactivity in the rat CNS: distribution and regulation by corticosteroids. *J Comp Neurol*, 313: 522-538.
- Alfonso J, Pollevick GD, van Der Hart MG, Flugge G, Fuchs E, Frasch AC.** (2004). Identification of genes regulated by chronic psychosocial stress and antidepressant treatment in the hippocampus. *Eur J Neurosci*, 19(3):659-666.
- Almazan G, Honegger P, Du Pasquier P, Matthieu JM.** (1986). Dexamethasone Stimulates the Biochemical Differentiation of Fetal Forebrain Cells in Reaggregation Cultures. *Dev Neurosc*, 8:14-23.
- Ambrosius H und Lupp H.** (1987). *Immunhistochemie -Grundlagen und Technik.* Akademie Verlag Berlin, 184-186.
- Amiel-Tison C, Cabrol D, Denver R, Jarreau PH, Papiernik E, Piazza PV.** (2004). Fetal adaptation to stress. Part I: acceleration of fetal maturation and earlier birth triggered by placental insufficiency in humans. *Early Hum Dev*, 78(1):15-27.
- Anderson AB, Gennser G, Jeremy JY, Ohrlander S, Sayers L, Turnbull AC.** (1977). Placental transfer and metabolism of betamethasone in human pregnancy. *Obstet Gynecol*, 49(4):471-474.
- Antonow-Schlorke I, Helgert A, Gey C, Bauer R, Schwab M, Schubert H, Nathanielsz PW, Brodhun M.** Applicability of Cerebral Myelin Staining is Related To Brain Development. In Vorbereitung.
- Antonow-Schlorke I, Helgert A, Gey C, Coksaygen T, Schubert H, Nathanielsz PW, Witte OW, Schwab M.** (2009). Adverse effect of antenatal glucocorticoids on cerebral myelination in sheep. *Obstet Gynecol*, 142-151.
- Astrom KE.** (1967). On the early development of the isocortex in fetal sheep. *Prog Brain Res*, 26:1-59.
- Back SA, Luo NL, Borenstein NS, Levine JM, Volpe JJ, Kinney HC.** (2001). Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury. *J Neurosci*, 21:1302-1312.
- Back SA, Riddle A, Hohimer AR.** (2006). Role of instrumented fetal sheep preparations in defining the pathogenesis of human periventricular white-matter injury. *J Child Neurol*, 21:582-589.

- Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS.** (1993). Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet*, 341(8850):938-941.
- Barkovich AJ, Kjos BO, Jackson DE, Norman D.** (1988). Normal maturation of the neonatal and infant brain: MR imaging at 1.5 T. *Radiology*, 166:173-180.
- Bartzokis G.** (2004). Age-related myelin breakdown: a developmental model of cognitive decline and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 25:5-18.
- Baumann N, Pham-Dinh D.** (2001). Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev*, 81:871-927.
- Behrens H, Ganter M, Hiepe T, Braun U.** (2001). *Lehrbuch der Schafkrankheiten – mit 41 Tabellen und Video auf CD-ROM*. Vierte Aufl. Berlin: Parey.
- Beversdorf DQ, Manning SE, Hillier A, Anderson SL, Nordgren RE, Walters SE, Nagaraja HN, Cooley WC, Gaelic SE, Bauman ML.** (2005). Timing of prenatal stressors and autism. *J Autism Dev Disord*, 35:471-478.
- Bodhireddy SR, Lyman WD, Rashbaum WK, Weidenheim KM.** (1994). Immunohistochemical detection of myelin basic protein is a sensitive marker of myelination in second trimester human fetal spinal cord. *Journal of Neuropathol and Exp Neurol*, 53(2):144-149.
- Boggs JM.** (2006). Myelin basic protein: a multifunctional protein, *Cellular and Molecular Life Sci*, 63:1945-1961.
- Brodhun M, Coksaygan T, Antonow-Schlorke I, Müller T, Schubert H, Patt S, Nathanielsz PW, Schwab M.** (2003). Acute effects of antenatal betamethasone treatment on apoptosis and glucocorticoid receptor density in fetal sheep brain. *J Soc Gynecol Invest*, 10:710.
- Brodhun M, Coksaygan T, Antonow-Schlorke I, Müller T, Schubert H, Patt S, Nathanielsz PW, Schwab M.** (2003). Association of programmed cell death and glucocorticoid receptors during brain development in fetal sheep. *J Soc Gynecol Invest*, 10:765.
- Brunner C, Lassmann H, Waehneltd TV, Matthieu JM, Linington C.** (1989). Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendroglial glycoprotein, and 2'3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats. *J Neurochem*, 53:296-304.
- Bzoskie L, Blount L, Kashiwai K, Tseng YT, Hay WW, Padbury JF.** (1995). Placental norepinephrine clearance: in vivo measurement and physiological role. *J Physiol*, 269:145-149.
- Cadet R et al.** (1986). Effects of prenatal maternal stress on the pituitary adrenocortical reactivity in guinea-pig pups. *J Dev Physiol*, 8:467-475.
- Campos-Ortega JA.** (2001). Ontogenie des Nervensystems und der Sinnesorgane. In: Dudel J, Menzel R, Schmidt RF. *Neurowissenschaft-Vom Molekül zur Kognition*. 2.Aufl., Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 63-86.

- Catalani A, Casolini P, Cigliana G, Scaccianoce S, Consoli C, Cinque C, Zuena AR, Angelucci L.** (2002). Maternal corticosterone influences behavior, stress response and corticosteroid receptors in the female rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 73(1):105-114.
- Challis JR, Fraher L, Oosterhuis J, White SE, Bocking AD.** (1989). Fetal and maternal endocrine responses to prolonged reductions in uterine blood flow in pregnant sheep. *Am J Obstet Gynecol*, 160(4):926–32.
- ChallisJRG, Matthews SG, Gibb GW und Lye SJ.** (2000). Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endocr Rev*, 21:514-550.
- Challis J.** (2001). The fetal placental hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, parturition and post natal health. *Mol Cell Endocrinol*, 185(1-2):135–44.
- Chowen JA, Goya L, Ramos S, Busiguina S, Garcia-Segura LM, Argente J, Pascual-Leone AM.** (2002). Effects of early undernutrition on the brain insulin-like growth factor-I system. *J Neuroendocrinol* 14: 163–169.
- Chrousos GP.** (1998). Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann N Y Acad Sci*, 851:311-335.
- Claes SJ.** (2004). CRH, stress, and major depression: a psychobiological interplay. *Vitam Horm*, 69: 117–150.
- Clapp JF.** (1992). Restricted fetal oxygen supply: a cause of intrauterine growth retardation in: Künzel W, Kirschbaum M (eds) *Oxygen: Basis of the regulation of vital functions in the fetus*. Springer,Berlin Heidelberg New York, pp 217–222.
- Cliver SP, Goldenburg RL, Cutter GR, Hoffman HJ, Copper RL, Gotlieb SJ, Davis O.** (1992). The relationships among psychosocial profile, maternal size, and smoking in predicting fetal growth retardation. *Obset Gynecol*, 80:262-267.
- Cook SC, Wellman CL.** (2004). Chronic stress alters dendritic morphology in ratmedial prefrontal cortex. *J Neurobiol*, 60(2):236-48.
- Coe CL, Kramer M, Czeh B, Gould E, Reeves AJ, Kirschbaum C et al.** (2003). Prenatal stress diminishes the neurogenesis in the dentate gyrus of juvenil rhesus monkeys. *Biological Psychiatry*, 54:1025-1034.
- Coe CL, Lulbach GR, Schneider ML.** (2002). Prenatal disturbance alters the size of the corpus callosum in young monkeys. *Developmental Psychobiol*, 41:178-185.
- Corcoran C, Walker E, Huot R, Mittal V, Tessner K, Kestler L, Malaspina D.** (2003). The stress cascade and schizophrenia: etiology and onset. *Schizophr Bull*, 29: 671– 692.
- Czèh B, Perez-Cruz C, Fuchs E, Flügge G.** (2008). Chronic stress-induced cellular changes in the medial prefrontal cortex and their potential clinical implications: Does hemisphere location matter? *Behav Brain Res*, 190:1-13.
- Da Costa AP, Leigh AE, Man M, Kendrick KM.** (2004). Face pictures reduce behavioural, autonomic, endocrine and neural indices of stress and fear in sheep. *The Royal Soc* 271:2077-2084.



- Dalziel SR, Lim VK, Lambert A, McCarthy D, Parag V, Rodgers A, Harding JE.** (2005). Antenatal exposure to betamethasone: psychological functioning and health related quality of life 31 years after inclusion in randomised controlled trial. *BMJ*, 331:665.
- Davis EP, Sandman CA.** (2010). The timing of prenatal exposure to maternal cortisol and psychosocial stress is associated with human infant cognitive development. *Child Dev*, 81:131-148.
- Dessens AB, Haas HS, Koppe JG.** (2000). Twenty-year follow-up of antenatal corticosteroid treatment. *Pediatrics*, 105(6):77.
- Deuschle M, Schweiger U, Weber B, Gotthardt U, Korner A, Schmider J, Standhardt H, Lammers CH, Heuser I.** (1997). Diurnal activity and pulsatility of the hypothalamus-pituitary- adrenal system in male depressed patients and healthy controls. *J Clin Endocrinol Metab*, 82: 234–238.
- Diego MA, Field T, Reif MH, Schanberg S, Kuhn C, Gonzales-Quintero VH.** (2009). Prenatal depression restricts fetal growth. *Early Hum Devel*, 85:65-70.
- Dobbing J, Sands J.** (1979). Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev*, 3:79-83.
- Dugovic C, Maccari S, Weibel L, Turek FW, Van Reeth O.** (1999). High corticosterone levels in prenatally stressed rats predict persistent paradoxical sleep alterations. *J Neurosci*, 19(19):8656-8664.
- Dunlop SA, Archer MA, Quinlivan JA, Beazley LD, Newnham P.** (1997). Repeated Prenatal Corticosteroids Delay Myelination in the Ovine Central Nervous System. *The Journal of Maternal-Fetal Medicine* 6309-313.
- Dy J, Guan H, Sampath-Kumar R, Richardson BS, Yang K.** (2008). Placental 11beta-hydroxysteroiddehydrogenase type 2 is reduced in pregnancies complicated with idiopathic intrauterine growth restriction: evidence that this is associated with an attenuated ratio of cortisone to cortisol in the umbilical artery. *Placenta*, 29:193-200.
- Ebendal T.** (1992). Function and evolution in the NGF family and its receptors. *J Neurosci Res*, 32(4):461-470.
- Eriksson JG.** (2010). Early Programming of Later Health and Disease: Factors Acting During Prenatal Life Might Have Lifelong Consequences. *Diabetes*, 59:2349-2350.
- Espinosa A. de los Monteros, J.de Vellis.** (1990). *Oligodendrocyte Differentiation: Developmental and functional Subpopulations*. Springer Verlag Berlin Heidelberg.
- Frasch M.G., Müller T., Wicher C., Weiss C., W. Löhle M., Schwab K., Schubert H., Nathanielsz, P.W., Witte O.W., Schwab M.** (2007). Fetal body weight and the development of the control of the cardiovascular system in fetal sheep. *J Physiol (Lond)* 579:893-907.
- French NP, Hagan R, Evans SF, Godfrey M, Newnham JP.** (1999). Repeated antenatal corticosteroids: size at birth and subsequent development. *J Obstet Gynecol*, 180:114-121.

- French NP, Hagan R, Evans SF, Mullan A, Newnham JP.** (2004). Repeated antenatal corticosteroids: Effects on cerebral palsy and childhood behavior. *J Obstet Gynecol*, 190(3):588-595.
- Fride E, Dan Y, Feldon J, Halevy G, Weinstock M.** (1986). Effects of prenatal stress on vulnerability to stress in prepubertal and adult rats. *Physiol and Behav*, 37:681-687.
- Frim DM, RobinsonBG, Emanuel RL, Smas CM, Adler GK, Mayzoud JA.** (1988). Characterization and gestational regulation of corticotropine releasing hormone messenger RNA in human placenta. *J. Clin Invest*, 82:287-291.
- Gicquel C, El-Osta A, Le Bouc Y.** (2008). Epigenetic regulation and fetal programming. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 22: 1–16.
- Giedd J N.** (2004). Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. *Ann N Y Acad Sci*, 1021:77-85.
- Gitau R, Fisk NM, Teixeira JM, Cameron A, Glover V.** (2001). Fetal hypothalamic pituitary-adrenal stress responses to invasive procedures are independent of maternal responses. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(1):104-109.
- Goland RS, Wardlaw SL, Blum M, Tropper PJ, Stark RI.** (1988). Biologically active corticotropin-releasing hormone in maternal and fetal plasma during pregnancy. *J Obst Gynecol*, 159:884-890.
- Griffiths IR, Klugmann M, Anderson TJ, Thomson C, Vouyiouklis D, Nave KA.** (1998). Current concepts of PLP and its role in the nervous system. *Microsc Res Tech*, 41:344-358.
- Grodd W.** (1993). Kernspintomographie neuropädiatrischer Erkrankungen. Normale Reifung des kindlichen Gehirns. *Klin Neuroradiol*, 3:1-27.
- Grodd W.** (1993). Normal and abnormal patterns of myelin development of the fetal and infantile human brain using magnetic resonance imaging. *Curr Opin Neurol Neurosurg*, 6:393-397.
- Groh T.** (2009). Zur Entstehung der Schlafstadien und ihrer chronischen Beeinflussung durch eine pränatale Glukokortikoidbehandlung zur Förderung der Lungenreifung. Jena: Friedrich Schiller Universität, Diss.
- Groh T, Schwab K, Coksaygen T, Müller T, Schubert H, Witte OW, Nathanielsz PW, Schwab M.** (2007). Glukokortikoideffekte auf die funktionelle Hinentwicklung und die Reifung der Schlafstadien. *Somnology* 11 (Suppl. 1): 70.
- Grote NK, Bridge JA, Gavin AR, MelvilleJL, Iyengars, Katon WJ.** (2010). A Meta-analysis of Depression During Pregnancy and the Risk of Preterm Birth, Low Birth Weight, and Intrauterine Growth Restriction. *Arch Gen Psychiatry*, 67(10):1012-1024.
- GuttelingBM, de Weerth C, Buitelaar JK.** (2005). Prenatal stress and children's cortisol reaction to the first day of school. *Psychoneuroendocrinol*, 30:541-549.
- Harris A, Seckl J.** (2011) Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Horm Behav*. 59(3):279-89.

- Hasegawa M, Houdou S, Mito T, Takashima S, Asanuma K, Ohno T.** (1992). Development of myelination in the human fetal and infant cerebrum: A Myelin basic protein immunohistochemical study. *Brain Dev*, 14:1-6.
- Hassan AH, von Rosenstiel P, Patchev VK, Holsboer F, Almeida OF.** (1996). Exacerbation of apoptosis in the dentate gyrus of the aged rat by dexamethasone and the protective role of corticosterone. *Exp Neurol*, 140: 43-52.
- Hayakawa K, Konishi Y, Kuriyama M, Konishi K, Matsuda T.** (1990). Normal brain maturation in MRI. *Eur J Rad*, 12:208-215.
- Helgert A.** (2008). Der zeitliche Verlauf der Myelinisierung im Gehirn des Schaffeten – Effekte von Betamethason: Jena: Friedrich Schiller Universität, Diss.
- Henry C, Kabbaj M, Simon H, Le Moal M und Maccari S.** (1994). Prenatal stress increase the hypothalamio-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats. *J Neuroendocrinol*, 6:341-345.
- Herman JP.** (2009). Stress Response: Neural and Feedback Regulation of the HPA Axis. Elsevier, 505-510.
- Hittmair K, Wimberger D, Rand T, Prayer L, Bernert G, Kramer J, Imhof H.** (1994). MR assessment of brain maturation: comparison of sequences. *AJNR*, 15:425-433.
- Hogue CJ, Bremner JD.** (2005). Stress model for research into preterm delivery among black women American J of obstet and gynecol, 192:47-55.
- Holmes MC, Abrahamsen CT, French KL, Paterson JM, Mullins JJ, Seckl JR.** (2006). The mother or the fetus? 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 null mice provide evidence for direct fetal programming of behaviour by endogenous glucocorticoids. *J Neurosci*, 26:3840-3844.
- Hosseini-sharifabad M, Hadinedoushan H.** (2007). Prenatal stress induces learning deficits and is associated with a decrease in granules and CA3 cell dendritic tree size in rat hippocampus. *Anatom Sci Internat*, 82:211-217.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H.** (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, 29:577-580.
- <https://www.msu.edu/~brains/brains/sheep/index.html>**.
- Huang WL, Beazley LD, Quinlivan JA, Evans SF, Newnham JP, Dunlop SA.** (1999). Effect of corticosteroids on brain growth in fetal sheep. *Obstet Gynecol*, 94(2):213-218.
- Huang WL, Harper CG, Evans SF, Newnham JP, Dunlpo SA.** (2001). Repeated prenatal corticosteroid administration delays myelination of the corpus callosum in fetal sheep. *J Devl Neurosci* 19:415-425.
- Huizink AC, Mulder EJH, Buitelaar JK.** (2004). Prenatal stress and risk for psychopathology: specific effects or induction of general susceptibility? *Psychol Bull*, 130(1):115-142.

- Jakovcevski I, Zecevic N.** (2005). Sequence of oligodendrocyte development in the human fetal telencephalon. *Glia*, 49:480-491.
- Jeff M, Tiwari-Woodniff B and S.** (2006). Tight Junction in CNS Myelin. In: Gonzalez-Mariscal L. *Tight Junctions*, Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, LLC. New York, USA, 196-205.
- Joels M, de Kloet ER.** (1992). Control of neuronal excitability by corticosteroid hormones. *Trends Neurosci*, 15:25-30.
- Joels M, de Kloet ER.** (1994). Mineralcorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for permeability and transmitter systems. *Prog Neurobiol*, 43:1-36.
- Johnson JI, Sudheimer KD, Davis KK, Kerndt GM, Winn BM.** (2012). The Sheep Brain Atlas. Michigan State University: Brain Biodiversity Bank.  
<https://www.msu.edu/~brains/index.html>
- Kajiser M, Edstedt Bonamy AK, Akre O, Cnattingius S, Granath F, Norman M, Ekblom A.** (2009). Perinatal Risk Factors for Diabetes in Later Life. *AM Diabetes Association*, 58:523-526.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM.** (2000). Principles of neural science. 4th ed. USA: McGraw-Hill Companies.
- Kang G, Ye K, Liu N, Allison DB, Gao G.** (2009). Weighted multiple hypothesis testing procedures. *Stat Appl Genet Mol Biol*, 8(1):Article23.
- Keller-Wood M, Dallmann MF.** (1984). Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocrine Rev* 5(1):1-24.
- Khashan AS, Abel KM, McNamee R, Pedersen MG, Webb RT, Baker PN, Kenny LC, Mortensen PB.** (2008). Higher risk of offspring schizophrenia following antenatal maternal exposure to severe adverse life events. *Arch Gen Psychiatry*, 65(2):146-152.
- Kinney D, Hyman W, Greetham C, Tramer Sa.** (1999). Increased relative risk for schizophrenia and prenatal exposure to a severe tornado. *Schizophrenia Research*, 13:45-46.
- Kinney HC, Karthigasan J, Borenshteyn NI, Flax JD, Kirschner DA.** (1994). Myelination in the Developing Human Brain: Biochemical Correlates. *Neurochemical Research*, 19(8):983-996.
- Kitraki E, Karandres D, Kittas C.** (1999). Long-Lasting Effects of Stress on Glucocorticoid Receptor Gene Expression in the Rat Brain. *Neuroendocrin*, 69:331-338.
- Klugmann M, Schwab MH, Puhlhofer A, Schneider A, Zimmermann F, Griffiths IR et al.** (1997). Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipidprotein. *Neuron*, 18:59-70.
- Koehl M, Darnaudéry M, Dulluc J, Van Reeth O, Le Moal M, Maccari S.** (1999). Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo–pituitary–adrenal axis and hippocampal corticosteroid receptors in adult rats of both gender. *J Neurobiol*, 40:302-315.
- Koelsch S, Rempis A, Sammler D, Jentschke S, Mietchen D, Fritz T, Bonnemeier H, Siebel WA.** (2007). A cardiac signature of emotionality. *Eur. J. Neurosci*, 26, 3328–3338.

- Krishnaveni G, Veena S, Dhube A, Karat S, Phillips D, Fall C.** (2013). Size at birth, morning cortisol and cardiometabolic risk markers in healthy Indian children. *Clin Endocrinol Oxf*
- Lang U, Graz U, Fink D, Kimming R.** (2008). Fetale Programmierung. *Gynäkol Geburtshilf Rundsch*, 48:205-206.
- Lang U, Zygmunt M, Künzel W, Clark KE.** (2001). Fetale Wachstumsrestriktion im Tiermodell. *Der Gynäkologe*, 34:820-832.
- Langley-Evans SC, Phillips GJ, Benediktsson R, Gardner DS, Edwards CR, Jackson AA, Seckl JR.** (1996). Protein intake in pregnancy, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension in the rat. *Placenta*, 17:169–172.
- Lazarus RF.** (1984). *Stress, Appraisal and Coping*. New York: Springer.
- Leeson CPM, Kattenhorn M, Morley R, Lucas A, Deanfield JE.** (2001). Impact of Low Birth Weight and Cardiovascular Risk Factors on Endothelial Function in Early Adult Life. *Circulation (American Heart Association)* 103:1264-1268.
- Lemaire V, Koehl M, Moal M, Abrous DN.** (2000). Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *PNAS*, 97(20):11032-11037.
- Levison SW, Chuang C, Abramson BJ, Goldman JE.** (1993). The migrational patterns and developmental fates of glial precursors in the rat subventricular zone are temporally regulated. *Development*, 119:611-622.
- Liggins GC.** (1969). Premature delivery of foetal lambs infused with glucocorticoids. *J Endocrinol*, 45(4):515-523.
- Liston C, Miller MM, Goldwater DS, Radley JJ, Rocher AB, Hof PR.** (2006). Stress-induced alterations in prefrontal cortical dendritic morphology predict selective impairments in perceptual attentional set-shifting. *J Neurosci*, 26(30):7870-7874.
- Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C., Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM, Meaney MJ.** (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic–pituitary–adrenal responses to stress. *Science*, 277:1659-1662.
- Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C.** (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Rev Neurosci*, 10:434-445.
- MacArthur BA, Howie RN, Dezoete JA, Elkins J.** (1982). School progress and cognitive development of 6-year-old children whose mothers were treated antenatally with betamethasone. *Pediatrics*, 70(1):99-105.
- Malaspina D, Corcoran C, Kleinhaus KR, Perrin MC, Fennig S, Nahon D, Friedlander Y, Harlap S.** (2008). Acute maternal stress in pregnancy and schizophrenia in offspring: a cohort prospective study. *BMC Psychiatry*, 8:71.
- Maric NP, Dunjic B, Stojiljkovic DJ, Britvic D, Jasovic-Gasic M.** (2009). Prenatal stress during the 1999 bombing associated with lower birth weight—a study of 3,815 births from Belgrade. *Arch Womens Ment Health*, 13:83-89.

- Martin E, Krassnitzer S, Kaelin P, Boesch C.** (1991). MR imaging of the brainstem: normal postnatal development. *Neuroradiology*, 19:1129-1136.
- Mastorakos G, Ilias I.** (2003). Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and postpartum. *Ann N Y Acad Sci*, 997:136-149.
- Matthews SG.** (2001). Antenatal glucocorticoids and the developing brain: mechanisms of action. *Semin Neonatol*, 6:309-317.
- Matthews SG.** (2002). Early programming of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Trends Endocrinol Metab*, 13:363-408.
- McCalla CO, Nacharaju VL, Muneyyirci-Delale O, Glasgow S, Feldman JG.** (1998). Placental 11[beta]-hydroxysteroid dehydrogenase activity in normotensive and pre-eclamptic pregnancies. *Steroids*, 63: 511-515.
- McCormick CM, Smythe JW, Sharma S, Meaney MJ.** (1995). Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats. *Dev. Brain Res*, 84:55-61.
- McEwen BS, De Kloet ER, Rostene W.** (1986). Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol Rev*, 66:1121-1188.
- McIntosh GH, Baghurst KI, Potter BJ, Hetzel BS.** (1979). Foetal brain development in the sheep. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 5(2):103-14.
- McMillen IC, Rattanatrak L, Duffield JA, Morrison JL, MacLaughlin SM, Gentili S, Muhlhausler BS.** (2009). The early origins of later obesity: pathways and mechanisms. *Adv Exp Med Biol*, 646:71-81.
- McMillen IC, Robinson JS.** (2005). Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev*, 85: 571-633.
- McMorris FA, McKinnon RD.** (1996). Regulation of oligodendrocyte development and CNS myelination by growth factors: prospects for therapy of demyelinating disease. *Brain Pathol*, 6:313-329.
- Meaney MJ, Aitken DH, Viau V, Sharma S, Sarrieau A.** (1989). Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. *Neuroendocrin*, 50:597-604.
- Meaney MJ, Szyf M.** (2005). Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. *Dialogues Clin Neurosci*, 7: 103-123.
- Meaney MJ, Szyf M, Seckl JR.** (2007). Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health. *Trends Mol Med*, 13(7):269-77.
- Meyer-Bahlburg HFL, Dolezal C, Baker SW, Carlson AD, Obeid JS, New MI.** (2004). Cognitive and motor development of children with and without congenital adrenal hyperplasia after early-prenatal dexamethasone. *J Clin Endocrinol Metab*, 89:610-614.

- Michaelis R, Niemann GW.** (2004). Entwicklungsneurologie und Neuropädiatrie-Grundlagen und diagnostische Strategien. 3.Aufl.Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 16-23.
- Michelsen KA, Van den Hove DL, Schmitz C, Segers O, Prickaerts J, Steinbusch HWM.** (2007). Prenatal stress and subsequent exposure to chronic mild stress influence dendritic spine density and morphology in the rat medial prefrontal cortex. *BMC Neurosci*, 8:1-8.
- Miller DB, O'Callaghan JP.** (2002). Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Metabolism*, 51:5-10.
- Morell P, Quarles RH, Norton WT.** (1994). Neural membranes: myelin formation, structure, and biochemistry. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB, Hrsg. *Basic Neurochemistry*. New York: Raven Press, 117-143.
- Morgane PJ, Mokler DJ, Galler JR.** (2002). Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev*, 26(4):471-83.
- Morrison JL.** (2008). Sheep Models of intrauterine growth restriction: Fetal adaptations and consequences. *Clin And experim Pharmacol And Physiol*, 35:730-743.
- Moscarello MA.** (1997). Myelin basic protein, the executive molecule of the myelin membrane. In: Juurlink BHJ, Devon RM, Doucette JR, Nazarali RJ, Schreyer DJ, Verge VMK, Hrsg. *Cell biology and pathology of myelin: evolving biological concepts and therapeutic approaches*. New York: Plenum Press, 13-25.
- Moss TJ, Doherty DA, Nitsos I, Sloboda DM, Harding R, Newnham JP.** (2005). Effects into adulthood of single or repeated antenatal corticosteroids in sheep. *J Obstet Gynecol*, 192:146-152.
- Mueller BR, Bale TL.** (2008). Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy. *J Neurosci*, 28(36):9055-9065.
- Mueser KT, McGurk SR.** (2004). Schizophrenia. *Lancet*, 363:2063-2072.
- Mulder EJ, Robles de Medina PG, Huizink AC, Van den Bergh BR, Buitelaar JK, Visser GH.** (2002). Prenatal maternal stress: effects on pregnancy and the (unborn) child. *Early human Devel*, 70:3-14.
- Mulisch M, Welsch U.** (2010). *Romeis. Mikroskopische Technik*. 18.Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Müller T, Schubert H, Schwab M.** (2003). Early prediction of fetal numbers in sheep based on peripheral plasma progesterone concentrations and season of the year. *Veterinary Record*, 152:137-138.
- Murmu MS, Salomon S, Biala Y, Weinstock M, Braun K, Bock J.** (2006). Changes of spine density and dendritic complexity in the prefrontal cortex in offspring of mothers exposed to stress during pregnancy. *European J of Neurosci*, 24:1477-1487.
- Murphy KE, Hannah ME, Willan AR, Willan AR, Hewson SA, Kelly EN, Matthews SG, Saigal S, Asztalos E, Ross S, Delisle MF, Amankwah K, Guselle P, Gafni A, Lee SK, Armson BA, MACS Collaborative Group.** (2008). Multiple courses of antenatal corticosteroids for preterm birth (MACS): a randomised controlled trial. *Lancet*, 372:2143-2151.



- Murphy VE, Gibson PG, Giles WB, Zakar T, Smith R, Bisits AM, Kessell CG, Clifton VL.** (2003). Maternal asthma is associated with reduced female fetal growth . *Am J Respir Crit Care Med*, 168:1317-1323.
- Mychasiuk R, Gibb R, Kolb B.** (2012). Prenatal Stress Alters Dendritic Morphology and Synaptic Connectivity in the Prefrontal Cortex and Hippocampus of Developing Offspring. *Synapse* 66:308–314.
- Nakagawa H, Iwasaki S, Kichikawa K, Fukusumi A, Taoka T, Ohishi H, Uchida H.** (1998). Normal myelination of anatomic nerve fiber bundles: MR analysis. *AJNR*, 19:1129-1136.
- Nuyt AM, Alexander BT.** (2009). Developmental programming and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 18(2):144-52.
- Nyirenda MJ, Carter R, Tang JI, de Vries A, Schlumbohm C, Hillier SG, StreitF, Oellerich M, Armstrong VW, Fuchs E, Seckl JR.** (2009). Prenatal programming of metabolic syndrome in the common marmoset is associated with increased expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *Diabetes*. 58(12):2873-9.
- O'Connor TG, Heron J, Golding J, Glover V, the AL SPAC Study Team.** (2003). Maternal antenatal anxiety and behavioural/emotional problems in children: a test of a programming hypothesis. *J of Child Psychol and Psychi*, 44:1025-1036.
- Packan DR, Sapolsky RM.** (1990). Glucocorticoid endangerment of the hippocampus: tissue, steroid and receptor specificity. *Neuroendocrinology* 51: 613-618.
- Pedraza L, Fidler L, Staugaitis SM, Colman DR.** (1997). The active transport of myelin basic protein into the nucleus suggests a regulatory role in myelination. *Neuron*, 18:579-589.
- Peles E, Salzer JL.** (2000). Molecular domains of myelinated axons. *Curr. Opin. Neurobiol*, 10:558-565.
- Perez-Cruz C, Muller-Keuker JIH, Heilbronner U, Fuchs E, Flugge G.** (2007). Morphology of pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: lateralized dendritic remodeling by chronic stress. *Neural Plasticity Article ID 46276*.
- Pfeiffer SE, Warrington AE, Bansal R.** (1993). The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends in cell biology*, 3:191-197.
- Phillips D, Jones A.** (2006). Fetal programming of autonomic and HPA function: do people who were small babies have enhanced stressresponses? *J Physiol*, 572:45-50
- Plagemann A.** (2005). Fetale Programmierung und funktionelle Teratologie. In: Ganten, Ruckpaul, Wauer (eds.): *Molekularmedizinische Grundlagen von fetalen und neonatalen Erkrankungen*, Springer Verlag, 325-344.
- Quarles RH.** (1997). Glykoproteins of Myelin Sheaths. *Journal of Molecular Neurosci*, 8:1-3.
- Qinlivan JA, Dunlop SA, Evans SF, Beazley LD, Newnham JP.** (1999). Repeated, but not single, maternal administration of corticosteroids delays myelination in the brain of fetal sheep. *Prenatal und Neonatal Med*, 4:47.

- Radley JJ, Arias CM, Sawchenko PE.** (2006). Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. *J Neurosci*, 6:12967-12976.
- Radley JJ, Rocher AB, JanssenWG, Hof PR, McEwen BS, Morrison JH.** (2005). Reversibility of apical dendritic retraction in the rat medial prefrontal cortex following repeated stress. *Exp Neurol*, 196(1):199-203.
- Raine CS.** (1984). Morphology of myelin and myelination in Myelin. 2nd edition (ed. P. Morell). Plenum Press, New York, USA, 1-50.
- Rakers F.** (2011). Der Einfluss von chronischem Stress während der Schwangerschaft auf die funktionelle Reifung des fetalen zentralen Nervensystems. Jena: Friedrich-Schiller-Universität, Diss.
- Rakers F, Bischoff SJ, Schiffner R, Rupprecht S, Haase M, Schubert H, Nathanielsz PW, Schwab M.** (2013). *Reprod Sci* 2013, 20 Suppl. 432
- Rakers F, Frauendorf V, Rupprecht S, Schiffner R, Bischoff S, Kientopf M, Schubert H, Schwab M.** (in press). Effects of early and mid-gestational maternal stress and Synthetic Glucocorticoids on Development of the Fetal hypothalamic–pituitary–adrenal axis in sheep. *J Stress*.
- Reiser G, Kunzelmann U, Steinhilber G, Binmoller FJ.** (1994). Generation of a monoclonal antibody against the myelin protein CNP (2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase) suitable for biochemical and for immunohistochemical investigations of CNP. *Neurochem Res*, 19:1479-1485.
- Reul JM, de Kloet ER.** (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, 117(6):2505-2511.
- Rice F, Jones I, Thapar A.** (2007). The impact of gestational stress and prenatal growth on emotional problems in offspring: a review. *Acta Psychiatr Scand*, 115:171-183.
- Rinaudo P, Wang E.** (2011). Fetal programming and metabolic syndrome. *Annu Rev Physiol*, 74:107-30.
- Robinson BG, Emanuel RL, Frim DM, Majzoub JA.** (1988). Glucocorticoid stimulates expression of corticotropin releasing hormone gene in human placenta, 85:5244-5248.
- Rodriguez A, Bohlin G.** (2005). Are maternal smoking and stress during pregnancy related to ADHD symptoms in children? *J Child Psychol Psychiatry*, 46(3):246-254.
- Romijn HJ, Hofman MA, Gramsbergen A.** (1991). At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby? *Early Hum Dev*, 26(1):61-7.
- Rondo´ PHC, Ferreira RF, Nogueira F, Ribeiro MCR, Lobert H, Artes R.** (2003). Maternal psychological stress and distress as predictors of low birth weight, prematurity and intrauterine growth retardation. *Europ J of Clin Nutrition*, 57:266–272.
- Rose JC, Kute TE, Winkler L.** (1985). Glucocorticoid receptors in sheep brain tissues during development. *Am J Physiol*, 249(1):345-349.

- Roussel S, Boissy A., Montigny D, Hemsworth PH, Duvaux-Ponter C.** (2005). Gender-specific effects of prenatal stress on emotional reactivity and stress physiology of goat kids. *Hormones and Behavior*, 47:256-266.
- Ruiz RJ, Fullerton JT.** (1999). The measurement of stress in pregnancy. *Nursing and Health Sciences*, 1:19-25.
- Sampaio RC, Truwit CL.** (2001). Myelination in the developing human brain. In: Nelson CA, Luciana M (Hrsg) *Handbook of developmental cognitive neuroscience*. Bradford, Cambridge, MA, 35-44.
- Sapolsky RM, Uno H, Rebert CS, Finch CE.** (1990). Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J Neurosci*, 10: 2897-2902.
- Scaccianoce S, Catalani A, Lombardo K, Consoli C, Angelucci L.** (2001). Maternal glucocorticoid hormone influences nerve growth factor expression in the developing rat brain. *Neuroreport*, 12(13):2881-2884.
- Schleußner E.** (2011). Fetale Programmierung. In: Schneider H, Husslein WP, Schneider KTW, Hrsg. *Die Geburtshilfe*, Vierte Aufl. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag IV:617-632.
- Schmand B, Neuvel J, Smolders-de Haas H, Hoeks J, Treffers PE, Koppe JG.** (1990). Psychological development of children who were treated antenatally with corticosteroids to prevent respiratory distress syndrome. *Pediatrics*, 86:58-64.
- Schneider ML, Roughton EC, Koehler AJ, Lubach GR.** (1999). Growth and development following prenatal stress exposure in primates: an examination of ontogenetic vulnerability. *Child Dev*, 70(2):263-274.
- Schneider ML, Moore CF, Kraemer GW, Roberts AD, DeJesus OT.** (2002). The impact of prenatal stress, fetal alcohol exposure, or both on development: perspectives from a primate model. *Psychoneuroendocrinol*, 27:285-298.
- Schlottz W, Phillips DIW.** (2009). Fetal origins of mental health: Evidence and mechanisms. *Brain Behav Immun*, 23: 905-916.
- Schwab M.** (2007). Fetale Hirnentwicklung und Programmierung von zerebralen Funktionsstörungen: Einfluss von pränataler Mangelernährung, Stress und Glukokortikoiden. *Gynäkologie*, 4:256-263.
- Schwab M.** (2009). Intrauterine Programmierung von Störungen der Hirnfunktion im späteren Leben. *Gynäkol-geburtshilfl Rundschau*, 49:13-28.
- Schwab M, Heinemann S, Schwab K, Thoms I, Rupprecht S, Hoyer H, Ligges C, Hoyer, D, Schleussner E.** (2010). Effects of prenatal betamethasone exposure on cortical activity at the age of eight years-a pilot study *Reprod Sci*, 17 Suppl.:791.
- Schwab M, Lichmann G, Maurer I, Loehle M, Nathanielsz P, Witte O.** (2006). Antenatal glucocorticoids suppress mitochondrial activity but do not decrease ATP content in the fetal ovine brain. *J Soc Gynecol Invest*, 13:732.

- Schwab M, Reymann D, Schinzel C, Witte OW.** (2007). Clinical doses of prenatal glucocorticoids induce profound changes of the renal and cerebral vascular tone in the aged rat. *Early Human Dev*, 83: 79.
- Scolding NJ, Frith S, Linington C, Morgan BP, Campbell AK, Compston DAS.** (1989). Myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG) is a surface marker of oligodendrocyte maturation. *J. Neuroimmunol*, 22:169-176.
- Scully JL, Otten U.** (1995). Glucocorticoids, neutrophins and neurodegeneration. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 52:391-401.
- Seckl JR.** (2008). Glucocorticoids, developmental 'programming' and the risk of affective dysfunction. A superb review that summarized prenatal work and linked it to clinical implications. *Prog. Brain Res*, 167:17-34.
- Seib LM, Wellmann CL.** (2002). Daily injections alter spine density in rat medial prefrontal cortex. *Neurosc Letters*, 337:29-32.
- Sloboda DM, Challis JRG, Moss TJM, Newham JP.** (2005). Synthetic Glucocorticoids: Antenatal Administration and Long-term Implications. *Cur Pharmaceut Design*, 11:1459-1472.
- Sloboda DM, Moss TJM, Li S, Matthews SG, Challis JRG, Newnham JP.** (2008). Expression of glucocorticoid receptor, mineralocorticoid receptor, and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1 and 2 in the fetal and postnatal ovine hippocampus: ontogeny and effects of prenatal glucocorticoid exposure. *J Endocrinol*, 197(2):213-220.
- Speirs HJL, Seckl JR, Brown RW.** (2004). Ontogeny of glucocorticoid receptor and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type-1 gene expression identifies potential critical periods of glucocorticoid susceptibility during development. *J Endocrinol*, 181(1):105–16.
- Staudt M, Krägeloh-Mannl, Grodd W.** (2000). Die normale Myelinisierung des kindlichen Gehirns in der MRT - Eine Metaanalyse. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 172:802-811.
- Staudt M, Schropp C, Staudt F, Obletter N, Bise K, Breit A.** (1993). Myelination of the brain in MRI: a staging system. *Pediatr Radiol*, 23:169-176.
- Staudt M, Schropp C, Staudt F, Obletter N, Bise K, Breit A, Weinmann HM.** (1994). MRI assessment of myelination: an age standardization. *Pediatr Radiol*, 24:122-127.
- Stevens AD, Lumbers ER.** (1995). Effects of intravenous infusions of noradrenaline into the pregnant ewe on uterine blood flow, fetal renal function, and lung liquid flow. *Can J. Physiol Pharmacol*, 73:202-208.
- Strauss A, Heer IMP, Müller-Egloff S, Burges A.** (2008). *Ultraschallpraxis Geburtshilfe und Gynäkologie*. Heidelberg, Springer Medizin Verlag, 14: 55.
- Stricker T, Martin E, Boesch C.** (1990). Development of the human cerebellum observed with high-field-strength MR imaging. *Radiology*, 177:431-435.
- Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ.** (2005). The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Res Rev*, 4: 141–194.

- Szuran TF, Pliška V, Pokorny J, Welzl H.** (2000). Prenatal stress in rats: effects on plasma corticosterone, hippocampal glucocorticoid receptors, and maze performance. *Physiol. Behav*, 71:353-362.
- Takahashi LK.** (1998). Prenatal stress-Consequences of Glucocorticoids on hippocampal development and function. *J Devl Neurosci*, 16:88-196.
- Tanaka S, Mito T, Takahima S.** (1995) Progress of myelination in the human fetal spinal nerve roots, spinal cord and brainstem with myelin basic protein immunohistochemistry. *Early Hum Dev*, 41:49-59.
- Teicher MH, Andersen SL, Polcari A, Anderson CM, Navalta CP, Kim DM.** (2003). The neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment. *Neurosci and Biobehav Rev*, 27:33-44.
- Teicher MH, Ito Y, Glod CA, Schiffer F, Gelbard HA.** (1996). Neurophysiological mechanisms of stress response in children. In: Pfeffer C, editor. *Severe stress and mental disturbance in children*. Washington, DC: American Psych Assoc Press, 59-84.
- Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE.** (1994). Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr Rev*; 15: 80–101.
- Trapp BD, Bernier L, Andrews SB, Colman DR.** (1988). Cellular and subcellular distribution of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase and its mRNA in the rat central nervous system. *J Neurochem*, 51:859-868.
- Trepel M.** (2004). *Neuroanatomie*. Dritte Aufl. München, Jena: Urban und Fischer Verlag, 6-8; 234-236.
- Ulfig N.** (2005). *Kurzlehrbuch Embryologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 31; 135-144
- Ulrich-Lai YM, Herman JP.** (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Rev Neurosci*, 10:397-409.
- Uno H, Eisele S, Sakai A, Shelton S, Baker E, DeJesus O, Holden J.** (1994). Neurotoxicity of glucocorticoids in the primate brain. *Horm Behav* 28: 336-348.
- Uno H, Lohmiller L, Thieme C, Kemnitz JW, Engle MJ, Roecker EB, Farrell PM.** (1990). Brain damage induced by prenatal exposure to dexamethasone in fetal rhesus macaques. I. Hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res*, 53(2):157-167.
- Van den Bergh BRH, Marcoen A.** (2004). High antenatal maternal anxiety is related to ADHD symptoms, externalizing problems, and anxiety in 8- and 9-year-olds. *Child Dev*, 75(4):1085-1097.
- Van den Bergh BRH, Mulder EJH, Mennes M, Glover V.** (2005). Antenatal maternal anxiety and stress and the neurobehavioural development of the fetus and child: links and possible mechanisms. A review *Neurosci Biobehav Rev*, 29(2):237–258.
- Van den Hove DL, Steinbusch HW, Scheepens A, Van de Berg WD, Kooimann LA, Boosten BJ.** (2006). Prenatal stress and neonatal rat brain development. *Neurosci*, 137:145-155.

- Van Os J, Selten JP.** (1998). Prenatal exposure to maternal stress and subsequent schizophrenia. The May 1940 invasion of The Netherlands. *Br J Psychiatry*, 172:324-326.
- Viérin M, Bouissou MF.** (2001). Pregnancy is associated with low fear reactions in ewes. *Physiol Behav*, 72(4):579-587.
- Wadhwa PD, Culhane JF, Rauh V, Barve SS, Hogan V, Sandmann CA, Hobel CJ, Chicz-de Met A, Dunkel-Schetter C, Garite TJ, Glynn L.** (2001). Stress, infection and preterm birth: a biobehavioural perspective. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 15:17-29.
- Wadhwa PD.** (2005). Psychoneuroendocrine processes in human pregnancy influence fetal development and health. *Psychoneuroendocrinology*, 30:724-743.
- Ward HE, Johnson EA, Salm AK, Birkle DL.** (2000). Effects of prenatal stress on defensive withdrawal behavior and corticotropin releasing factor systems in rat brain. *Physiol. Behav*, 70:359-366.
- Watson JB, Mednick SA, Huttunen M, Wang X.** (1999). Prenatal teratogens and the development of adult mental illness. *Dev Psychopathol*, 11(3):457-66.
- Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Meaney MS and MJ.** (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. The first paper to show that early experience has epigenetic effects, altering methylation patterns. *Nature Neurosci*, 7:847-854.
- Wehner R, Gehring W.** (1995). *Zoologie*. 23. Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 351-394.
- Weinstock M.** (2008). The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosciund Biobehav Rev*, 32:1073–1086.
- Weinstock M, Matlina E, Maor GI, Rosen H, Mc Ewen BS.** (1992). Prenatal stress selectivity alters the reactivity of the hypothalamic-pituitary adrenal system in female rat. *Brain Res*, 595:195-200.
- Weinstock M.** (2001). Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog Neurobiol*, 65:427-451.
- Weinstock M, Poltyrev T, Apfelbaum DS, Men D, McCarty R.** (1998). Effect of prenatal stress on plasma corticosterone and catecholamines in response to footshock in rats. *Physiol Behav*, 64:439-444.
- Welberg LA, Seckl JR.** (2001). Prenatal Stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *J Neuroendocrinol*, 13:113-128.
- Welberg LA, Thirivikraman KV, Plotsky PM.** (2005). Chronic maternal stress inhibits the capacity to up-regulate placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity. *J Endocrinol*, 186:7-12.
- White PC.** (2001). 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and its role in the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Am J Med Sci*, 322:308–315.
- Wurtman RJ.** (2002). Stress and the adrenocortical control of epinephrine synthesis. *Metabolism*, 51:11-14.

## 8 Anhang

### 8.1 Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank für die hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung meiner Doktorarbeit geht vor allem an Herrn Prof. Dr. med. Matthias Schwab und Frau Iwa Antonow-Schlorke.

Herr Prof. Dr. med. Matthias Schwab danke ich für die Vergabe des Themas, seine fachliche Begleitung während des gesamten Projektes und seine vielfältigen Anregungen und kritischen Hinweisen im Zuge des Erstellungsprozesses dieser Arbeit.

Einen herzlichen Dank richte ich an Frau Iwa Antonow-Schlorke, die mir von Beginn an bei der Planung und Ausführung der praktischen Arbeiten zur Seite stand, mich stets motivierte weiter zu machen und ihre wertvollen Erfahrungen an mich weiter gab. Ich danke ihr für die unzähligen Stunden, in denen wir Literatur gewälzt und diskutiert haben.

Vielen Dank an Frau Claudia Sommer und Frau Ina Ingrisich für die Unterstützung bei der Erlernung und Durchführung der Färbetechniken.

Einen großen Dank an das Team im Institut für Versuchstierkunde für die Durchführung der experimentellen Tierversuche.

Ein besonderer Dank gilt meinem Mann, der mich von Anfang an in meinem Vorhaben unterstützte, mir mit Rat und Tat bei so manchem Problem zur Seite stand und mich nie an der Fertigstellung dieser Arbeit zweifeln lies.

Ganz herzlich danke ich meinen Eltern und Schwiegereltern für ihre immerwährende Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Ausbildung.

Ebenso möchte ich meinen lieben Freunden danken, die mich stets aufbauten und für die erforderliche Abwechslung sorgten.

## 8.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- Herr Prof. Dr. med. Matthias Schwab (Klinik für Neurologie)
- Frau Iwa Antonow-Schlorke (Forschungszentrum der Universitätsklinik Jena)

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Gotha, den 31.03.2014

Julia Quendt